

**Degeneration und Regeneration
nach cerebraler Ischämie am Modell
der neonatalen Ratte P7**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Maria Elsa Spiegler
geboren am 12.09.1982 in Greiz

Jena, den 28.09.2007

Gutachter

1. Prof. Dr. G. Jirikowski, Jena
2. PD Dr. Chr. Redecker, Jena
3. Prof. C. Charriaut-Marlangue, Paris

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. März 2008

Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Abb	Abbildung
ACC	Arteria carotis communis
ACM	Arteria cerebri media
ACMO	Arteria cerebri media Okklusion
AW	Anregungswellenlänge
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine
Cy3	Carbocyanin3
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
EW	Emissionswellenlänge
et al	und andere
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
IgG	Immunglobulin
KZL	Körnerzellschicht
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
µm	Mikrometer
MV	Mikroskopvergrößerung
nm	Nanometer
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI	Postischämie
PIT	Postischämietag
PNT	Postnataltag
Std Abw	Standardabweichung
TUNEL	Terminal-Transferase-Uridin-Nick-End-Labeling
vs	versus
ZSV	Zona subventricularis
ZSG	Zona subgranularis

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Résumé	1
1. Einleitung	5
1.1. Cerebrale Ischämie beim Menschen und im Tiermodell	5
1.2. Zelluntergang nach cerebraler Ischämie	6
1.3. Proliferation, Neurogenese und Migration nach cerebraler Ischämie	8
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Tiermodell	14
2.2. Histochemische Methoden	16
2.2.1. Gewebeaufbereitung	16
2.2.2. Visualisierung des Gewebeschadens	16
2.2.3. Visualisierung von Glia- und Progenitorzellen	17
2.2.4. Visualisierung von Proliferation, Neurogenese und Migration	19
2.2.5. Doppelmarkierung mit Immunofluoreszenz	21
2.3. Methoden zur Auswertung	24
3. Ergebnisse	26
3.1. Läsion und Zelltod nach cerebraler Ischämie	26
3.1.1. Entwicklung der Läsion in Abhängigkeit von der postischämischen Überlebenszeit	26
3.1.2. Morphometrische Messung der Hemisphärenflächen	28
3.1.3. Visualisierung des einzelnen Zelltodes	31
3.2. Reaktion von Glia- und Progenitorzellen auf cerebrale Ischämie	35
3.2.1. Vermehrtes Vorkommen von Astrozyten	35

3.2.2. Vermehrtes Vorkommen von neuroepithelialen Stammzellen	41
3.3. Proliferation, Neurogenese und Migration nach cerebraler Ischämie	45
3.3.1. Quantifizierung proliferierender Zellen in ZSV und GD	45
3.3.2. Neurogenese und Migration nach cerebraler Ischämie	50
3.4. Charakter der Proliferation und Neurogenese	66
3.4.1. Proliferation von neuroepithelialen Stammzellen	66
3.4.2. Proliferation von Astrozyten	68
3.4.3. Ausprägung neuronaler Progenitoren	71
3.4.4. Schicksal neu generierter Neurone	73
4. Diskussion	74
4.1. Tiermodell und Tierverhalten	74
4.2. Läsion und Zelltod nach cerebraler Ischämie	75
4.3. Vermehrtes Auftreten von Glia- und Progenitorzellen	79
4.4. Proliferation, Neurogenese und Migration	81
5. Ausblick	88
Literaturverzeichnis	90
Publikation	98
Danksagung	99
Ehrenwörtliche Erklärung	100

Zusammenfassung

Die intrauterine oder perinatale Asphyxie mit daraus folgender Encephalopathie stellt eine häufige, noch wenig erforschte Ursache für entwicklungsneurologische Defizite bei Kindern dar. Umso dringlicher sind daher neue Forschungserkenntnisse zum besseren Verständnis der intracerebralen post-ischämischen Vorgänge und der raschen Entwicklung effektiver Therapiemethoden.

Ziel dieser Studie war es mit Hilfe eines Tiermodells den primär degenerativen Verlauf und hierauf folgende regenerative Prozesse nach fokaler cerebraler Ischämie zu charakterisieren.

So konnte tatsächlich ein hohes autoregeneratives Potential von Neugeborenen nachgewiesen werden. Umso mehr drängt sich daher die Frage auf, weshalb trotzdem eine so häufige klinische Symptomatik vorliegt.

Die Untersuchung zellulärer Prozesse infolge einer solchen ischämischen Periode bei Neugeborenen bedurfte eines möglichst kliniknahen Tiermodells. Das von der Pariser Forschungsgruppe „Hypoxie und Ischämie im sich entwickelnden Gehirn“ (HICD, Institut UMR 7102–CNRS) erarbeitete Verfahren zur Erzeugung einer transienten fokalen Ischämie in sieben Tage alten Wistar-Ratten erwies sich dabei als ein gutes, auch die in ihrem Einfluss stark umstrittene Reperusionsphase einschließendes Modell. Zudem entspricht das Alter der Ratten von sieben Tagen dem Reifegrad menschlicher Neugeborener. Die Induktion eines kortikalen Infarktes erfolgte über die permanente Okklusion der linken Arteria cerebri media und einen temporären Verschluss der gleichseitigen Arteria carotis communis.

Zur Zellmarkierung in Hinblick auf die jeweiligen Fragestellungen wurden vielfältige histochemische bzw. Immunofluoreszenz-Methoden angewandt und mikroskopisch ausgewertet.

Folgen der Ischämie waren der primäre nekrotisch-apoptotische Zelltod im direkten Einzugsgebiet der verschlossenen Arteria cerebri media und die sekundäre Apoptose in der Penumbra und in entfernteren, nicht unmittelbar vom Infarkt betroffenen ipsilateralen und contralateralen Hirnregionen.

Letztendlich entstand die für Jungtiere typische Insult-Kavität.

Anhand dieser tierexperimentellen Untersuchungen wurde erstmals beschrieben, dass unmittelbar nach Ischämieinduktion auch die contralaterale Hemisphäreseite, sichtbar durch eine beträchtliche Größenverminderung im Vergleich zum gesunden Kontrolltier, stark beeinträchtigt wurde, sich jedoch funktionell von den Auswirkungen erholen konnte. Im Gegensatz dazu blieben die ipsilateralen Seitenmaße auch zu späten postischämischen Zeitpunkten noch stark vermindert.

Anschließend konnten deutliche regenerative Prozesse infolge der Ischämie nachgewiesen werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die bekannten Zonen lebenslanger Proliferation, die Zona subventricularis und die Zona subgranularis des Gyrus dentatus. In beiden Zonen wurde eine insultgetriggerte Zellvermehrung sichtbar, wobei erstmalig drei zeitlich gut differenzierbare proliferative Maxima zu erkennen und bestimmten Zelltypen zuzuordnen waren.

Interessanterweise spiegelten sich sämtliche Vorgänge der Läsionsseite in etwas abgeschwächter Form

auch in der contralateralen Hemisphäre wider, ein Hinweis auf eine weitaus größere Einflussnahme der Ischämie auf infarktferne Regionen sowohl in degenerativer als auch regenerativer Hinsicht, als bisher vermutet.

Weitere Experimente zeigten die Migration von in der Zona subventricularis neu generierten Neuronen in an die Kavität angrenzende Areale, wo sie sich scheinbar, sichtbar an den morphologischen Veränderungen, weiterentwickeln und möglicherweise funktionale Netzwerke bilden. Auch auf der contralateralen Hemisphärenseite wurde eine Migration erkennbar. Im nicht direkt vom Infarkt betroffenen Gyrus dentatus wurde ebenfalls Neurogenese sichtbar, eine eindeutige Migration der neu gebildeten Zellen konnte anhand dieser Studie jedoch nicht eruiert werden. Zudem konnten die regenerativen Geschehnisse hier weniger deutlich von denen der Kontrolltiere differenziert werden. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war die Darstellung des vermehrten Vorkommens von Glia- und Progenitorzellen infolge Ischämie. Ihr Auftreten sowie ihre Morphologie schienen dabei stark in Zusammenhang mit zeitlichen und örtlichen Komponenten zu stehen. Insbesondere den Astrozyten muss eine große Bedeutung zugemessen werden. Ihr zahlreiches Erscheinen in verschiedensten Hirnarealen sowie ihre große morphologische Diversität sprechen für ein enormes zum Teil noch ungeklärtes Funktionsspektrum dieses Zelltypes. Hier ist sogar ein neuronaler Entwicklungsweg über eine astrozytäre Vorstufe denkbar.

Weiterhin wurde ein insultgetriggelter Anstieg von Vorläuferzellen ermittelt, die zu frühen postischämischen Zeitpunkten proliferierten und sich im weiteren Verlauf neuronal differenzieren konnten.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass bei der Ratte postnatal Neuroregeneration infolge cerebraler Ischämie regelmäßig vorkommt. Es konnten verschiedene Formen und Wege zur Bildung neuer Nervenzellen nachgewiesen werden, die wiederum vielfältige Ansätze zur Therapie bieten. Inwieweit jedoch diese morphologischen Beobachtungen mit der bekannten funktionellen Regeneration bei Tieren und auch beim Menschen nach cerebralen Insulten korrelieren, werden weitere Untersuchungen zeigen.

Résumé

L'asphyxie intra-utérine ou périnatale suivie d'une encéphalopathie est une des raisons encore peu explorées mais aussi une des plus courantes pour justifier les déficits neuronal-développementaux chez l'enfant. C'est pourquoi il faut développer des nouvelles connaissances pour une meilleure compréhension des processus intra-cérébraux après une ischémie et le développement rapide des méthodes de thérapie plus efficaces.

Le but de cette étude a été, premièrement, de caractériser les processus dégénératifs et régénératifs après une ischémie cérébrale focale suivants à l'aide d'animaux.

Ainsi, nous avons prouvé le grand potentiel autorégénératif des nouveaux-nés. Pourtant, une question se pose : pourquoi, malgré tout, trouve-t-on une symptomatique clinique si fréquente.

L'examen des processus cellulaires après une telle période ischémique chez le nouveaux-nés a nécessité un modèle d'animal aussi proche de la clinique que possible. La méthode développée par le Groupe « Hypoxie et Ischémie du Cerveau en Développement » (l'Institut UMR-CNRS 7102) de Paris générant une ischémie focale transitoire chez des rats Wistar à l'âge de 7 jours, s'avère être bon exemple, en incluant la période de reperfusion dont l'influence reste très contestée. En outre, l'âge des rats (7 jours) correspond au degré de maturité des nouveaux-nés humains. L'induction d'un infarctus corticale s'effectue par une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne en association avec une occlusion transitoire de l'artère carotidienne homolatérale.

Pour le marquage cellulaire en rapport aux questions respectives, des méthodes multiples en histochimie et immunofluorescence ont été utilisées, suivies par l'exploitation en microscopie. Une des conséquences de l'ischémie a été, premièrement, la mort cellulaire nécrotique-apoptotique dans la zone attenante de l'artère cérébrale moyenne et ensuite l'apoptose dans la pénombre et dans d'autres zones distantes de l'hémisphère ipsi- et contralatéral. En définitive, la cavité corticale s'est formée au fil du temps ce qui est typique pour le jeune animal.

A l'aide de ces investigations, il a été montré pour la première fois, que l'ischémie altère aussi l'hémisphère contralatéral visible par une réduction de sa surface pendant les premiers jours. En comparaison, chez un raton naïf de même âge, l'hémisphère contralatéral récupère ad integrum assez rapidement. Par contre, la surface du côté ipsilatéral reste réduite tout au long de la croissance du raton.

Ultérieurement, on a pu prouver des processus régénératifs importants à la suite d'une ischémie. Les deux zones connues de prolifération à vie : la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire du gyrus denté ont été le point central des investigations. Une multiplication cellulaire provoquée par l'infarctus a affleuré dans les deux zones. Dans ce cadre, trois points culminants de prolifération bien différenciables dans le temps et classables en types cellulaires particuliers ont été identifiés pour la première fois.

Finalement, il est intéressant de noter que tous les processus du côté lésionné se sont produits

également dans l'hémisphère contralatéral. Même si les quantités sont moindres, cela indique que l'influence de l'ischémie est plus grande que supposée jusqu'à présent en ce qui concerne la dégénération mais aussi de la régénération dans les zones distantes de l'infarctus.

Diverses expériences ont également montré une migration des neurones néoformés dans la zone sous-ventriculaire dans les domaines attenantes aux régions les plus exposés aux sinistres causés par l'infarctus. Là-bas ils peuvent particulièrement étoffer ce qui est visible par des changements morphologiques et un jour peut-être peuvent-ils développer un réseau fonctionnel.

Aussi, le gyrus denté qui n'a pas été affecté directement par l'infarctus montre une neurogénèse. Cependant, ici une migration des cellules néo-formées n'est pas incontestablement évidente. En outre les processus régénératifs sont moins différenciables entre les animaux lésionnés et les animaux contrôles.

Un résultat ultérieur de cette étude a été la présentation d'une augmentation du nombre de cellules gliales et des progéniteurs après une ischémie. Leur apparition et leur morphologie semblent être fortement liées à des composants temporels et locaux. En particulier, faut-il attribuer une importance plus grande aux astrocytes comme décrit dans la littérature jusqu'à présent. L'apparition nombreuse et la grande diversité morphologique de ce type cellulaire indiquent un spectre de fonction énorme mais en partie encore inexpliqué. Dans ce contexte, une voie de développement neuronale par un stade préliminaire astrocytaire devient même envisageable.

Par ailleurs, il a été montré qu'à la suite d'une ischémie, on avait une augmentation des progéniteurs. Ils ont proliféré à des temps précoces et se sont différenciés en neurones au fil du temps.

Les résultats présents prouvent que l'on a un gisement régulier d'une neuro-régénération postnatale chez le rat après une ischémie cérébrale. Des formes et voies diverses de la production des nouveaux neurones ont été découvert, ce qui offre à nouveau des perspectives de thérapie multiples. Des expériences ultérieures pourront être menées afin de déterminer à quel point ces observations morphologiques avec une régénération fonctionnelle connue chez l'animal pourraient être en corrélation avec l'homme.

1. Einleitung

1.1. Cerebrale Ischämie beim Menschen und im Tiermodell

Jedes Jahr erleiden in den Industrienationen circa 2 Millionen Menschen einen Schlaganfall, darunter allein 200.000 in Deutschland. Der Hirninfarkt steht somit an dritter Stelle der Todesursachen, gleich nach Krebserkrankungen und Herzinfarkt, wovon 75% durch Okklusion einer Arterie verursacht werden und 25% hämorrhagischer Natur sind (Ringelstein et al. 2006).

Jedoch spielt der Hirninfarkt nicht nur beim erwachsenen und alternden Menschen eine bedeutende Rolle, auch Kinder und insbesondere Neugeborene sind betroffen. So erleiden jährlich in Deutschland rund 1000 Kinder einen Hirnschaden nach perinatalem hypoxisch-ischämischem Insult (Ohr et al. 1995). Die so genannte neonatale hypoxisch-ischämische Encephalopathie wird zumeist durch eine schwere intrauterine Asphyxie hervorgerufen, welche einer Reduktion oder sogar einem vollständigen Stillstand der uterinen oder umbilicalen Zirkulation folgt. Diese Asphyxie wird in der Mehrheit der Fälle durch eine abruptio placentae, Uteruskontraktur, Verschluss der Vena cava oder aber durch Kompression der Nabelschnur provoziert. Weitere Ursachen sind postnatale respiratorische Insuffizienz und congenitale Herzinsuffizienz (Berger et al. 1999).

In den letzten Jahrzehnten wurde eine stabile Inzidenz anoxisch-ischämischer Neugeborener von 2-4 pro 1000 Lebendgeburten beobachtet, wovon 15-20% akut versterben und 25% der Überlebenden permanente neuropsychologische Defizite erleiden. Zu den neurologischen Folgeerscheinungen perinataler cerebraler Hypoxie-Ischämie zählen auch spastische Paresen, Ataxien und sensomotorische Störungen, eine retardierte Entwicklung sowie verschiedene Formen von Epilepsie (Vannucci und Perlman 1997).

Schwere und Dauer der Ischämie bestimmen das neuropathologische Ausmaß der neonatalen Encephalopathie. Aber auch Reifegrad, metabolischer Status und Körpertemperatur des Neugeborenen gehören zu den Einflußgrößen.

Bis zum heutigen Tage konnte noch keine grundlegende Behandlung der jungen Patienten entwickelt werden. Therapeutische Strategien beschränken sich bisher zumeist auf die Beeinflussung der genannten Faktoren. Neuere Studien empfehlen die Verabreichung von Magnesium, Barbituraten und die Einstellung einer milden Hypothermie mit dem Ziel der Neuroprotektion in den von Insult betroffenen Hirnarealen sowie Minderung des cerebralen Ödems infolge der Schädigung (Berger et al. 2001). Als ein weiterer Therapieansatz könnte

eines Tages die Beeinflussung möglicher autoreparativer Mechanismen dienen.

Zur besseren Erforschung cerebraler Hypoxie-Ischämie wurden verschiedene Tiermodelle zur Simulation eines neonatalen Hirninfarkts entwickelt. Das traditionelle Modell nach Rice und Vannucci an sieben Tage alten Wistar-Ratten besteht aus einer permanenten unilateralen Carotis-Ligatur und einer neunzigminütigen hypoxischen Periode (nur 8% Sauerstoffzufuhr). Die daraus resultierende Läsion ähnelt jener in reifen Neugeborenen nach perinataler Asphyxie. Das Phänomen des zweideutigen Einflusses der Reperusionsperiode (Zeit zwischen Wiederöffnung des zuvor verschlossenen Gefäßes bis zum Tod des Tieres) nach Schlaganfall veranlasste die Entwicklung weiterer Modelle. Ein permanenter Arteria cerebri media (ACM) Verschluss in Verbindung mit einem vorübergehenden Verschluss der gleichseitigen Arteria Carotis communis (ACC) erwies sich dabei als ein gutes, auch die Reperusionsperiode einschließendes Modell. Verschiedene neuropathologische Studien zeigten außerdem, dass Wistar-Ratten im Alter von sieben Tagen in ihrem histologischen Entwicklungsgrad dem des menschlichen Neugeborenen entsprechen (Renolleau et al. 1998).

1.2. Zelluntergang infolge cerebraler Ischämie

Bei der ischämischen Hirnschädigung handelt es sich um einen ständig fortlaufenden Prozess, der mit Einsetzen des Insults beginnt und sich im Reperusions-Intervall fortsetzt.

Cerebrale Ischämie verursacht durch den Sauerstoff- und folglich ATP-Mangel ein Versagen der zellulären Membranpumpen mit massivem extrazellulären Kalium-Anstieg sowie übermäßigem Natrium-, Calcium- und Wassereinstrom in die Zelle. Es handelt sich hierbei um den Vorgang der Exzitotoxizität unter anderem gekennzeichnet durch die erhöhte Glutamatfreisetzung. Es folgen darauf zytotoxische Ödembildung, vermehrte Entstehung freier Radikale, Mikroglia-Aktivierung und Leukozyten-Infiltration durch inflammatorische Mediatoren (Dirnagl et al. 1999). Jeder einzelne dieser Faktoren kann als ein Baustein auf dem Weg in den Zelltod angesehen werden, wobei man zwischen zwei Formen von Gewebeuntergang differenziert. Zum einen wird der nekrotische oder pathologische Zelltod beschrieben. Er wird durch äußere Noxeneinwirkung verursacht und mündet in den irreversiblen Funktionsverlust der Zelle. Die Nekrose kennzeichnet sich durch Zellschwellung, Verlust der Membran-integrität und Inflammation (Northington et al. 2001). Zum anderen findet man Apoptose, den physiologischen oder programmierten Zelltod, welcher durch gezielte Induktion zelleigener Mechanismen in Gang gesetzt wird. Man beobachtet Zellschrumpfung und Chromatinkondensation unter Erhalt der Membranintegrität. Letztendlich teilt sich die Zelle in kleinere Vesikel („apoptotic bodies“), welche von

Nachbarzellen aufgenommen werden (Hossain 2005). Bereits in der neuronalen Entwicklung spielt Apoptose eine entscheidende Rolle, da 90% der gebildeten Neuroblasten genetisch programmiert zugrunde gehen (Blaschke et al. 1996). Sie bleibt lebenslang bedeutend für die Steuerung von Zellzahl und physiologischer Zellregeneration durch Proliferation.

Nach cerebralem Insult können beide Zelltodformen sowohl im adulten als auch im neonatalen Tier nachgewiesen werden. Der eingeschlagene Todespfad hängt dabei ab von Art und Intensität des Stimulus, Zelltyp sowie Entwicklungsstadium der entsprechenden Zelle (Leist und Nicotera 1998). Die Nekrose gilt hierbei als der primäre, vorherrschende Mechanismus bei akutem und permanentem Gefäßverschluss, wohingegen Apoptose bei milder Hirnschädigung und als verzögerter (sekundärer) Zelltod Bedeutung findet (Dirnagl et al. 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptose im noch unreifen, neonatalen Gehirn überwiegt (McDonald et al. 1997, Li et al. 1998). So dienen eine Vielzahl noch wenig erforschter Faktoren als Stimuli erhöhter Protein-Synthese. Der Anstieg so genannter Todessignal-Proteine wie p53 oder Bax regt die Zelle zur Produktion DNA-schneidender Enzymkomplexe an, welche in Folge die zelleigene Kern-DNA fragmentieren und den apoptotischen Zelltod in unverhältnismäßiger Zahl auftreten lassen (Renolleau et al. 1997).

Insbesondere in infarktumgrenzenden Hirnarealen (Penumbra) werden überwiegend apoptotische Neurone angetroffen (Vannucci und Perlman 1997). Das Gebiet der Penumbra mit möglicherweise reversiblen Zellschaden hat sich als ein interessantes Ziel therapeutischer Intervention erwiesen.

Um das Ausmaß cerebraler Gewebeschädigung nach Ischämie eingrenzen zu können, verwendet man die weit verbreitete Methode der Cresyl Violet-Färbung. Cresyl Violet ist ein Farbstoff der Oxazin-Gruppe und bindet saure Komponenten des Cytoplasmas, wie die RNA reichen Ribosomen, aber auch Zellkerne und Nucleoli. In der Cytologie färbt es Cytoplasma blau, Kernchromatin rot-violett, Collagen in klarem Rot, Knorpel rot und Hämoglobin gelb.

Zur Veranschaulichung der Läsion bedient man sich des gegenteiligen Effektes, nämlich der verminderten Farbstoff-Anbindung an absterbende Zellstrukturen. Das Infarktgebiet erscheint somit deutlich heller als die kräftig gefärbten gesunden Hirnregionen. Die Läsion lässt sich also gut sichtbar abgrenzen.

Zur Visualisierung des einzelnen Zelltodes bedient man sich der TUNEL-Methode (Terminale-Transferase-Uridine-Nick-End-Labeling). In apoptotischen Zellen kommt es durch Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation zum Auftreten von DNA-

Doppelstrangbrüchen mit freien OH-Enden. Diese freien OH-Enden können wiederum durch die Terminale Transferase enzymatisch markiert werden. Eine Identifikation der einzelnen absterbenden Zelle in ihrem Gewebeverband wird somit möglich.

1.3 Proliferation, Neurogenese und Migration nach cerebraler Ischämie

Lange Zeit glaubte man nach cerebraler Läsion sei keine neuronale Regeneration möglich. Mit der Entdeckung von Hirnregionen, die scheinbar zeitlebens neurale Stammzellen enthalten, wie die den Seitenventrikeln anliegende Zona subventricularis (ZSV) und die Zona subgranularis (ZSG) des Gyrus dentatus (GD), wurde auch deren mögliche Weitervermehrung und Weiterdifferenzierung zur Ersetzung geschädigter Zellen nach Läsion denkbar (Cameron und McKay 1998).

Es wurde auch ein Proliferationsanstieg neuraler Progenitoren im GD der erwachsenen Ratte als Folge direkter Schädigung seiner ZSG nachgewiesen (Gould und Tanapat 1997).

Diese Beobachtung führte zu einer Vielzahl von Folgestudien und Publikationen. So erwies sich auch der ischämische Insult als ein Auslösereiz der Neurogenese neuronaler Stammzellen oder Progenitoren in der ZSV und im hippocampalen ZSG mit dem Unterschied, dass in diesem Fall die proliferativen Zonen nicht zum direkt geschädigten Gewebe gehören. Folglich müssen sie indirekt über noch wenig bekannte Mechanismen durch die cerebrale Ischämie zur Neurogenese angeregt werden. Dabei bewirken sowohl globale Ischämie (z.B. nach Herzversagen) als auch fokale Ischämie (z.B. durch Schlaganfall) einen Proliferationsanstieg in der ZSG. Eine fokale Ischämie allein führt zum Anstieg der Neurogenese in der ZSV. Die ZSV ist normalerweise Geburtsstätte neuraler Progenitoren, die entlang des rostralen Migrationsstromes (RMS) in den Bulbus olfactorius wandern und sich dort in Interneurone differenzieren (Luskin 1993). Einen weiteren Meilenstein in der Forschung stellt der Beweis der Migration dieser neu gebildeten Zellen in Richtung der insultgeschädigten Hirnregionen dar. So wandern die frisch generierten Neuroblasten der SGZ in das Innere der hippocampalen Körnerzellschicht, wo sie sich zu Körnerzellen differenzieren. Ähnlich verhalten sich die Neuroblasten der ZSV, die größtenteils infolge des Insults oder geringfügig bereits zuvor gebildet wurden (Arvidsson et al. 2002). Auch sie beginnen in Gebiete des geschädigten Striatums zu migrieren und Marker spezifisch für striatale Projektionsneurone zu exprimieren (Kokaia und Lindvall 2003) (Abb. 1). Jedoch ist bisher nicht vollständig bewiesen, ob diese neu gebildeten Neurone tatsächlich jene ersetzen, die in Folge des Insults abstarben. Weiterhin ungeklärt ist auch die Frage ihrer Funktionalität. Für eine funktionelle Wiederherstellung des neuronalen Netzes müssen sich die neuen Neurone in bestehende

Schaltkreise integrieren, indem sie synaptische Verbindungen untereinander aufbauen. Dies konnte bisher jedoch noch nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

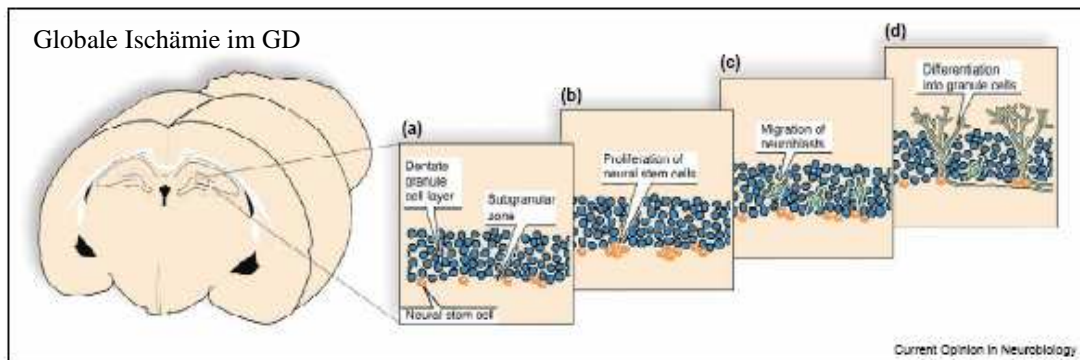
Mit dem Beleg der lebenslangen Neurogenese in der ZSV und SGZ und deren Anstieg nach Hirnschädigung beim Erwachsenen wuchs auch das Interesse an der Erforschung ähnlicher Mechanismen beim Kinde. Insbesondere der Einfluss des Insults auf Proliferation und Neurogenese im noch unreifen, sich entwickelnden Hirn des Neugeborenen im Vergleich zum Erwachsenen steht häufig im Mittelpunkt der Betrachtungen. Der Effekt von Hypoxie-Ischämie auf die ZSV der neonatalen Maus P10 zeigte eine signifikante Vergrößerung der ipsilateralen ZSV, welche direkt mit dem Grad des Hemisphärenschadens korrelierte und mit einem Proliferationsanstieg in dieser Region einherging. Einige der neu generierten Zellen exprimierten 14 Tage nach Läsionsinduktion einen neuronalen Phänotyp, der jedoch schon nach 21 Tagen kaum noch aufzufinden war. Diese Ergebnisse sprechen für eine kurzzeitige Stimulation der Neurogenese durch hypoxisch-ischämischen Insult (Plane et al. 2004).

Eine vergleichbare Studie an der postnatalen 7 Tage alten Ratte, welche einem hypoxisch-ischämischen Insult nach dem Modell von Rice und Vannucci unterzogen wurde (unilaterale Carotis-Ligatur und einer neunzigminütige hypoxische Periode), spiegelte ähnliche Fakten wider. Die ZSV zeigte ipsilateral innerhalb der ersten 3 Wochen nach Infarkt auch eine Vergrößerung, die ebenfalls mit einer entsprechenden Proliferationserhöhung verbunden war. Im selben Zeitraum konnten im Vergleich ipsi- zu contralateral auch vermehrt neu gebildete Neurone identifiziert werden, die häufig in Ketten in Richtung des verletzten Striatums angeordnet waren. Im Gegensatz zum Erwachsenenmodell wurden nach 4 Wochen keine neu gebildeten reifen striatalen Neurone entdeckt. Diese Daten demonstrieren in der ZSV Proliferation, Neurogenese und Migration der neu gebildeten Zellen in Folge neonataler Hypoxie-Ischämie. Jedoch scheint das umgebende Milieu unzureichend für das Überleben und Ausreifen der neu gebildeten Neurone zu sein (Ong et al. 2005).

Wenig bekannt ist momentan über die Rolle des neonatalen GD in Folge hypoxisch-ischämischer Schädigung. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte jedoch, dass sich im Hippocampus eine Vielzahl von postnatalen Entwicklungsprozessen bezüglich Neurogenese und neuronaler Differenzierung abspielen. Es wurde nachgewiesen, dass Zellproliferation hauptsächlich im hippocampalen Hilus, aber auch teilweise im GD auftritt. Die Untersuchungen weisen auf einen bedeutenden Anteil proliferierender Zellen im Hilus hin, die sich in proliferative Neuroblasten und unreife Neurone differenzieren und anschließend in die Körnerzellschicht migrieren (Namba et al. 2005). Von Interesse ist daher auch die Untersuchung möglicher Vorgänge im sich entwickelnden Hippocampus nach perinataler

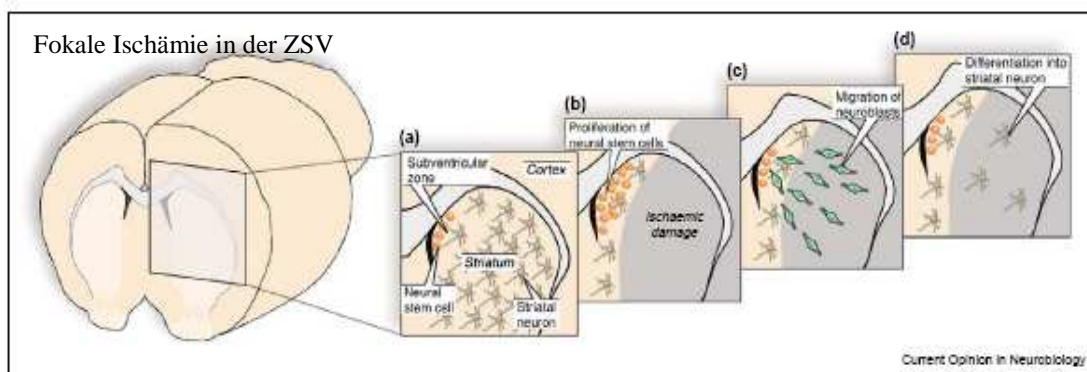
Hirnschädigung.

Abb. 1



Schematische Darstellung von Neurogenese im GD infolge globaler Ischämie. (a) Neurale Stammzellen liegen in der SGZ. (b) Globale Ischämie führt zu vermehrter Proliferation dieser Zellen (c)

Die neu gebildeten Zellen migrieren dann als Neuroblasten in die Körnerzellschicht (KZS) und (d) differenzieren sich in Körnerzellen.



Schematische Darstellung von Neurogenese in der ZSV infolge fokaler Ischämie. (a) Neurale Stammzellen liegen in der ZSV. (b) Fokal ischämische Schädigung führt zu ausgedehntem Verlust striataler und kortikaler Neurone und verursacht eine vermehrte Proliferation von Progenitoren. (c) Neuroblasten, die nach, aber auch teilweise vor der Ischämie gebildet wurden, migrieren dann in die geschädigten Regionen des Striatums, (d) wo sie für striatale Projektionsneurone typische Marker exprimieren.

(Kokaia et al. 2003. Curr Opin in Neurobiol, 13:127-132)

Die am häufigsten genutzte Methode zur Sichtbarmachung zellulärer Proliferation war lange Zeit die intraperitoneale Injektion von 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) wenige Tage vor Tötung des Tieres. Dieses Thymidin-Analogon bindet in der S-Phase des Zellzyklus an die DNA in sich teilenden Zellen und kann später durch Immunocytochemie veranschaulicht werden (Gratzner 1982). BrdU als ein exogener Marker kann möglicherweise toxische Effekte auf die Zelle ausüben oder sie an der weiteren Teilung hindern. Ein alternatives Verfahren stellt die Markierung des Kernproteins Ki-67 dar. Dieses endogene Protein wird von sich teilenden Zellen während des gesamten Mitosezyklus exprimiert, außer der R-Phase. Es hat somit den Vorteil, dass es nicht wie BrdU appliziert werden muss und, da natürlich vorkommend, auch keine negativen Einflüsse auf lebende Zellen ausübt (Kee et al. 2002). Ki-67 ist ein anerkannter Marker cerebraler Proliferation, der nachweislich in proliferativen Zonen wie dem GD und der ZSV ausgeprägt wird.

Die Entwicklung des zentralen Nervensystems sowie die Migration von Neuroblasten ist verbunden mit der Expression des microtubulusbindenden Proteins Doublecortin (DCX). Neben dieser entwicklungsbedingten Funktion bleibt der DCX-Level in bestimmten Gebieten des erwachsenen Säugetierhirnes erhöht. Bei diesen Regionen handelt es sich in erster Linie um den GD, die ZSV in Verbindung mit dem rostralen Migrationsstrom (RMS) und dem Bulbus Olfactorius, die für ihre Fähigkeit, zeitlebens neue Neurone zu generieren, bekannt sind (Brown et al. 2003).

Bei DCX handelt es sich also um ein Phosphoprotein, das vorübergehend von proliferativen Progenitorzellen und neu gebildeten Neuroblasten gebildet wird. Weiterhin ist es an Microtubuli gebunden, die unerlässlich für die Migration von Zellen sind.

Mit Hilfe histochemischer Methoden können die natürlich ausgebildeten Zellmarker Ki-67 und DCX und somit die entsprechenden Zellen in Proliferation, Neurogenese sowie Migration veranschaulicht werden.

Nestin gilt als ein Protein der Familie der Intermediärfilamente. Es handelt sich hierbei um ein Neurofilament in neuroepithelialen Stammzellen des zentralen Nervensystems von Säugetieren. Nestin beinhaltende Vorläuferzellen sind Ursprung sowohl glialer als auch neuronaler Zelltypen. Vermutlich spielt es eine entscheidende Rolle bei postnatalen sowie adulten Umbildungs- und Reparaturvorgängen (Wei et al. 2002). Außerdem ist bekannt, dass dieses Protein ausschließlich von noch unreifen Zellstrukturen exprimiert wird, da die

terminale Zelldifferenzierung mit dem Verlust seiner Neuroaktivität verbunden ist. Es dient somit u.a. zur Unterscheidung zwischen reifen und unreifen Elementen sowie morphologischer Besonderheiten aufgrund der Markierung filamentöser Strukturen (Ehrmann et al. 2005).

Von besonderem Interesse war die Doppelmarkierung mit Ki67 und DCX zur besseren Charakterisierung proliferierender sowie neuronaler Zellen, aber auch die Einfachmarkierung von Progenitoren zur Untersuchung von Morphologie und Verteilungsmuster nach Ischämie.

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) kommt als Intermediärfilament im Cytoplasma von Gliazellen, vor allem in Astrozyten vor. Es gilt als ein für das zentrale Nervensystem spezifisches Protein, dessen Funktion bislang nicht vollständig geklärt wurde, vermutlich jedoch zur Beweglichkeit und Zellformkontrolle von Astrozyten beiträgt.

Astrozyten stellen im Säugetierhirn die Mehrheit der Gliazellen dar. Ihnen wird eine Beteiligung an der Regulation des cerebralen Flüssigkeits- sowie Kaliumhaushaltes zugesprochen.

Auch im pathologischen, läsionierten Organismus wird den Astrozyten eine wesentliche Rolle beigemessen. Zum einen werden sie hypertroph und ihre Fortsätze verdicken sich erheblich, zum anderen steigert sich ihre Immunoreaktivität für GFAP (Fagan et al. 1994). Man spricht hier von der reaktiven „Gliosis“. Weiterhin beobachtete man auch eine astrozytäre Phagozytoseaktivität von Nervenzellabfall. Die so genannte „Glianarbe“ bildet einen Ersatz degenerierten Nervengewebes und gilt als eine Ursache des häufigen Misslingens regenerativer Prozesse (Trendelenburg et al. 2005).

In dieser Arbeit waren zum einen die Untersuchung einer astrozytären Reaktion in Folge Ischämie mittels Einfachmarkierung sowie die Doppelmarkierung mit Ki67 zur Analyse eines astrozytären Anteils proliferierender Zellen von Interesse.

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit dient der Analyse von globalen Auswirkungen einer fokalen cerebralen Ischämie am Modell der postnatalen Ratte P7. Im Mittelpunkt stand die Betrachtung von Läsionsgeschehen, Proliferation, Neurogenese und Migration.

Durch einen chirurgischen Eingriff nach dem von Sylvain Renolleau entwickelten Verfahren erlitten die Tiere einen fokalen Hirninfarkt mit Reperusionsperiode (Renolleau et al. 1998). Von Interesse waren dabei insbesondere die postischämischen Vorgänge im Bereich des hippocampalen Gyrus dentatus (GD) und der angrenzenden Zona subventricularis (ZSV) entsprechend der Tafel 31 und Bregma -3,3mm im Hirnatlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson 1982). Beide Regionen sind für lebenslange Proliferation und Neurogenese bekannt. Ihre Funktion hinsichtlich cerebraler Entwicklung und Reparaturvorgänge konnte bisher jedoch nicht vollständig geklärt werden.

Die Tiere wurden in verschiedenen Zeitintervallen zwischen 4h und 42d nach Ischämie-Induktion getötet. Es sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. In welchen Hirnregionen erzeugt fokale cerebrale Ischämie einen Gewebe- bzw. Zellschaden und in welchem Ausmaß? Welchen Einfluss hat dabei die Länge der postischämischen Überlebenszeit?
2. Wie reagieren verschiedene Zelltypen auf cerebrale Ischämie in Abhängigkeit zur postischämischen Überlebenszeit?
3. Kommt es zu einer vermehrten Proliferation und Neurogenese in GD und ZSV infolge fokaler cerebraler Ischämie? Ist ein zeitlicher Verlauf erkennbar? Welche Zelltypen proliferieren? Gibt es Unterschiede in der Reaktion von ipsilateraler (Infarktseite) und contralateraler Hemisphäre sowie im Vergleich zu Kontrolltieren mit ungestörter Entwicklung?
4. Was geschieht mit den neu gebildeten Zellen? Können sie in geschädigte Hirnregionen migrieren? Sind sie fähig zu überleben und funktionale Netzwerke zu bilden?

Das in dieser Studie verwendete Ischämiemodell imitiert cerebrale Läsionserscheinungen in reifen menschlichen Neugeborenen nach perinataler Asphyxie. Anlass und Ziel dieser Untersuchungen war es das Wissen um neurobiologische Vorgänge einer perinatalen Encephalopathie zu erhöhen und somit mögliche Ansätze zur Therapie offen zulegen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell

Alle Experimente wurden unter strikter Übereinstimmung mit den Richtlinien der Französischen und Europäischen Gesellschaft für Fürsorge und experimentelle Nutzung von Tieren durchgeführt.

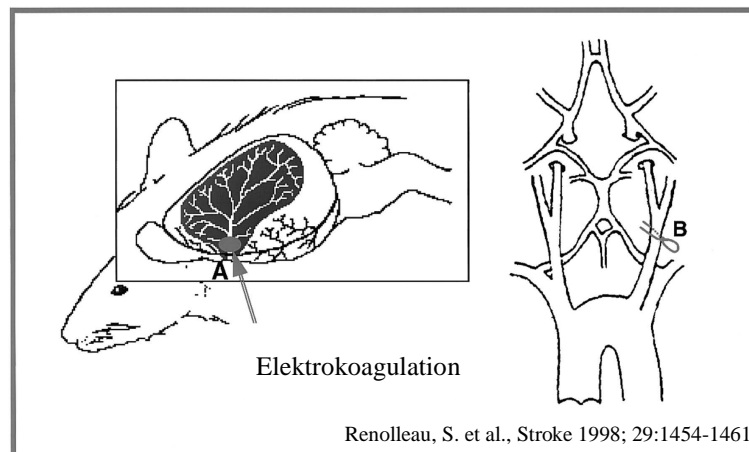
Wistar-Ratten im Alter von 7 Tagen (beiden Geschlechts, Gewicht zwischen 17 und 21g) wurden durch intraperitoneale Injektion von Chloral Hydrat (350mg/kg) anästhesiert. Nach 15 Minuten wurden die Ratten mit dem Rücken nach unten auf einem Heizkissen (Temperatur zwischen 37 und 38°C entsprechend ihrer Körpertemperatur) platziert und mit leicht überstrecktem Kopf fixiert.

Im Folgenden wurde die Haut am Hals median eingeschnitten und die linke Arteria carotis communis (ACC) freigelegt. Nach Umlagerung der Ratten auf ihre rechte Körperseite erfolgte ein zweiter Hautschnitt im Bereich zwischen linkem Auge und Ohr. Der nun sichtbare Musculus temporalis wurde entfernt und das noch weiche Cranium ausgehend von der Sutura frontalis bis zu einem Level unterhalb des Arcus zygomaticus vorsichtig abgetragen. Die linke Arteria cerebri media (ACM) wurde sichtbar und auf Höhe der Vena cerebri inferior vor ihrer Aufteilung in frontale und parietale Äste, permanent elektrokoagulierte. Der craniale Schnitt konnte nun verschlossen werden. Nach diesem Schritt wurden die Ratten erneut auf den Rücken gedreht und die ACC mit Hilfe einer Gefäß-Klemme für 50 Minuten okkludiert. Nach Entfernung des Clips und erfolgreicher Reperfusion der ACC unter mikroskopischer Beobachtung wurde diese Inzision ebenfalls verschlossen (Abb. 2).

Zum Erwachen wurden die Jungtiere in einen Inkubator mit einer Temperatur von 37°C gelegt und dann zu ihren Müttern zurückgebracht.

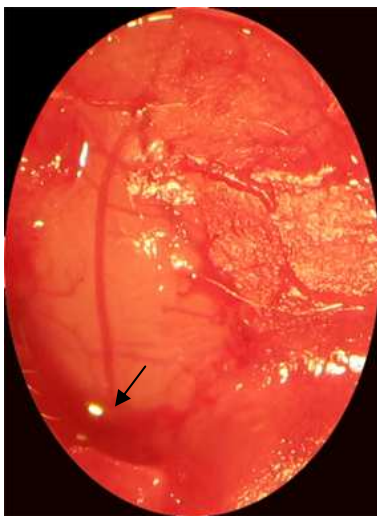
Als Kontrollen zu den Ischämietieren dienten Jungtiere im entsprechenden Alter, die keinem chirurgischen Eingriff unterzogen wurden (Renolleau et al. 1998).

Abb. 2 Tiermodell



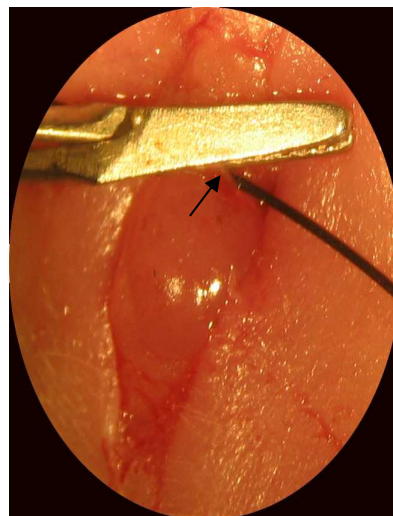
Schematische Abbildung zur Ischämie-Induktion in 7 Tage alten Wistar-Ratten. (A) Gefäßbaum der ACM mit Elektrokoagulationsstelle an ihrem Ursprung (Pfeil). (B) Cerebrale Gefäßversorgung und Position des Gefäßclips zur Okklusion der ACC.

A



ACM in vivo und Stelle der Elektrokoagulation (Pfeil)

B



ACC in vivo und Position des Gefäßclips (Pfeil) zur Okklusion

2.2. Histochemische Methoden

2.2.1. Gewebeaufbereitung

Die Tiere wurden in unterschiedlichen Zeitintervallen nach Ischämie-Induktion (zwischen 12h und 42d) durch Inhalation von Isofluran anästhesiert und anschließend dekapitiert. Gleichmaßen wurde mit Kontrolltieren im entsprechenden Alter zu den läsionierten Tieren verfahren. Fixierung und Konservierung der frei präparierten Hirne erfolgte zuerst für zwei Tage in 4%igem Paraformaldehyd und anschließend in 20%iger Saccharose-PBS-Lösung.

Die Hirne wurden am Cryostat in eine Dicke von 20 bzw. 50µm coronal geschnitten, auf gelatinisierten Objektträgern gesammelt und im Gefrierschrank bei -20°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

Von Interesse waren Schnitte auf dem Niveau des Hippocampus, entsprechend der Tafel 31, Bregma -3,3 mm im Hirnatlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson 1982).

2.2.2. Visualisierung des Gewebes Schadens

Cresyl-Violet-Färbung

Die Coronal-Schnitte wurden zur Beurteilung der Dimension des Gewebes Schadens mit Cresyl Violet gefärbt. Cresyl Violet als Farbstoff der Oxazin-Gruppe bindet saure Komponenten des Cytoplasmas, wie die RNA reichen Ribosomen, Zellkerne und Nucleoli. Geschädigte Zellen im Gebiet der Läsion absorbieren den Farbstoff in geringerem Masse als intakte Zellen im restlichen Gewebe. Die wesentlich hellere Infarktregion lässt sich daher deutlich abgrenzen.

Die Schnitte wurden entsprechend ihrer Stärke 6 Minuten (bei 20µm Dicke) in Cresyl Violet getaucht und dann in Ethanolbädern aufsteigender Konzentration von 70%, 95% und zweimal 100% für zwei Minuten pro Durchgang belassen. Nach Reinigung in einer Histo-ClearII-Lösung (Merck Eurolab, Fontenay-sous-bois, Frankreich) erfolgte die Eindeckelung mittels Eukitt (Eukitt Mounting Medium, Delta Microscopies, Labège, Frankreich).

TUNEL-Färbung

Bei der so genannten TUNEL (Terminal-Transferase-Uridin-Nick-End-Labeling)-Methode handelt es sich um die Markierung von DNA-Fragmenten in einzelnen apoptotischen Zellen mittels Immunofluoreszenz. DNA-Doppelstrangbrüche können durch Färbung freier 3'-OH-Enden mit modifizierten Nucleotiden durch enzymatische Vermittlung der Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) identifiziert werden. Fluorescein, welches in Nucleotidpolymere inkorporiert wurde, kann wiederum durch Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen und quantifiziert werden.

Die Behandlung der Hirnschnitte mit der TUNEL-Methode (mittels In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Meylan, Frankreich) wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Trocknung aus dem Gefrierschrank entnommener Hirnschnitte für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur
2. Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (75%iger, 90%iger und 2 mal 100%iger Alkohol, 2 Minuten pro Durchgang)
3. 2-minütige Inkubation auf Eis mit einer Permeabilisations-Lösung bestehend aus 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natrium-Citrat
4. Waschung in PBS 0,1M (pH 7,2) für 3 mal 5 Minuten
5. Vorbereitung der TUNEL-Reaktions-Mischung, bestehend aus 2 Lösungen (1: Enzym-Lösung, 2: Färbe-Lösung)
6. für 500µl der Reaktionsmischung 50µl der Enzymlösung zu 450µl Färbelösung hinzufügen
7. Inkubation der Hirnschnitte mit der TUNEL-Reaktionsmischung für 1h bei 37°C
8. Waschung in PBS 0,1M (pH 7,2) für 3 mal 5 Minuten
9. Eindeckelung der Hirnschnitte mit Mowiol (4-88, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland)

Die Auswertung der TUNEL-Färbung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (AW: 500nm, EW: 540nm, grün).

2.2.3. Visualisierung von Glia und Progenitorzellen

Visualisierung von Gliazellen mittels GFAP

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) erscheint als Intermediärfilament im Cytoplasma von Gliazellen. Insbesondere findet man es in Astrozyten, welche den überwiegenden Anteil der Gliazellen im Säugetierhirn darstellen. Astrozyten besitzen ein breites Aufgabenspektrum und sind somit besonders bedeutsam im cerebralen Zellgefüge.

Die Behandlung der Schnitte mit dem Antikörper Anti-GFAP wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Waschung der Hirnschnitte in 0,1M PBS für 3 mal 5 Minuten
2. Sättigung unspezifischer Verbindungen mittels 3% Normal-Ziegen-Serum in 0,1M PBS für 30 Minuten, direkt auf die Schnitte appliziert
3. Inkubation mit dem Antikörper Anti-GFAP-Cy3 (1:1000, Clone G-A-5, Sigma-

Aldrich, St-Quentin Fallavier, Frankreich) und 3% Normal-Ziegen-Serum in 0,1M PBS bei Raumtemperatur über Nacht

Am Folgetag:

4. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
5. Trocknung der Schnitte unter Lichtschutz
6. Eindeckelung mit Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, AbCys Vector Laboratories, Paris, Frankreich)

Die Auswertung der GFAP-Fluoreszenz-Markierung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (AW: 532nm, EW: 565, rot).

Visualisierung von Progenitorzellen mittels Nestin

Das Protein Nestin gehört zur Familie der Intermediärfilamente und wird hauptsächlich von neuroepithelialen Stammzellen exprimiert. Da Zellen im terminalen Differenzierungsstadium die Immunoreaktivität für dieses Protein verlieren, kann es als ein Marker zur Unterscheidung unreifer und reifer Elemente dienen.

Die Behandlung der Schnitte mit dem Antikörper Anti-Nestin wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Waschung der Hirnschnitte in 0,1M PBS für 3 mal 5 Minuten
2. Sättigung unspezifischer Verbindungen mittels 3% Normal-Pferde-Serum in 0,1M PBS für 30 Minuten, direkt auf die Schnitte appliziert
3. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Nestin (1:200, monoklonaler Maus-Antikörper, Clone Ratte 401, Chemicon International, Hampshire, UK) und 3% Normal-Pferde-Serum in 0,1M PBS bei Raumtemperatur über Nacht

Am Folgetag:

4. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
5. Inkubation mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Maus IG (1:500, entwickelt in Esel, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Asnieres, Frankreich) unter Lichtschutz bei Raumtemperatur für 2 Stunden
6. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten unter Lichtschutz
7. Trocknung der Schnitte unter Lichtschutz
8. Eindeckelung mit Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, AbCys

Vector Laboratories, Paris, Frankreich)

Die Auswertung der Nestin-Fluoreszenz-Markierung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (AW: 532nm, EW: 565, rot).

2.2.4. Visualisierung von Proliferation, Neurogenese und Migration

Vorbehandlung der Hirnschnitte

Um signifikantere Resultate durch eine bessere Penetration der Antikörper in das Gewebe zu erreichen, wurden die Schnitte mit einem Citrat-Puffer vorbehandelt.

Herstellung des Citrat-Puffers:

1. Lösung von Zitronensäure-Pulver ($C_6H_8O_7$, MG: 210,14, 1gM) in einem Liter destillierten Wasser unter Wärmezufuhr
2. Erhöhung der Lösung auf einen pH von 6 mit Hilfe von NaOH (2N)

Die Schnitte wurden anschließend in diesem Citrat-Puffer für 1 mal 5 Minuten und 2 mal 2 Minuten in der Mikrowelle bei 500Watt gekocht. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurden jeweils Abkühl-Pausen von einer Minute und am Ende von 30 Minuten eingehalten.

Visualisierung von Proliferation mit dem Antikörper Anti-Ki67

Ki67 ist ein Kernprotein, welches während der gesamten Dauer des mitotischen Zellzyklus, außer der R-Phase in sich teilenden Zellen exprimiert wird. Die Behandlung von Hirnschnitten mit Ki67-Antikörpern kann somit zur Untersuchung von Proliferation im Säugetier- Hirn genutzt werden.

Die Behandlung der Hirnschnitte mit dem Antikörper Anti-Ki67 wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Waschung der Schnitte in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
2. Inhibition der endogenen Peroxidase im 0,1M PBS-Bad mit 0,3% H_2O_2 und 10% Methanol für 10 Minuten
3. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 5 Minuten
4. Sättigung unspezifischer Verbindungen mittels 3% Normal-Ziegen-Serum in 0,1M PBS für 30 Minuten, direkt auf die Schnitte appliziert

Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Ki67 (1:200, polyklonaler Antikörper, entwickelt in Hase, NCL-Ki67p, Novocastra, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, Frankreich)

und 3% Normal-Ziegen-Serum in 0,1M PBS bei Raumtemperatur über Nacht

a) Immunohistochemische Methode zur Zellquantifizierung

5. Am Folgetag Waschung der Schnitte in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
6. Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG (1:200, entwickelt in Ziege, Vectastain, AbCys, Paris, Frankreich) und 3% Normal-Ziegen-Serum in 0,1M PBS bei Raumtemperatur für zwei Stunden
7. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
8. Inkubation mit einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Elite ABC-Kit, Vectastain) für eine Stunde (30 Minuten im Voraus vorzubereiten) in 0,1M PBS
9. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
10. Sichtbarmachung markierter Zellen mittels Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, Frankreich), 1 Tablette DAB in 1ml destillierten Wasser lösen und nach Zugabe von 5µl Wasserstoffperoxid direkt auf die Schnitte applizieren, Einwirkdauer 3-4 Minuten
11. Waschung in destilliertem Wasser für 3 mal 5 Minuten
12. Dehydration der Schnitte im Bad einer aufsteigenden Ethanolreihe 75%, 95%, 2 mal 100% , 2 Minuten pro Durchgang)
13. nach Reinigung in einer Histo-ClearII-Lösung (Merck Eurolab, Fontenay-sous-bois, Frankreich) erfolgte die Eindeckelung mittels Eukitt (Eukitt Mounting Medium, Delta Microscopies, Labège, Frankreich).

Die Auswertung der Ki67-Markierung erfolgte mittels Lichtmikroskopie.

b) Fluoreszenzmikroskopische Methode

6. Am Folgetag Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
7. Inkubation mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG (1:1000, entwickelt in Ziege, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, Frankreich) unter Lichtschutz bei Raumtemperatur für 2 Stunden
8. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten unter Lichtschutz
9. Trocknung der Schnitte unter Lichtschutz
10. Eindeckelung mit Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, AbCys, Vector Laboratories, Paris, Frankreich)

Die Auswertung der Ki67-Fluoreszenz-Markierung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (AW: 488nm, EM: 525nm, grün).

Visualisierung von Neurogenese und Migration mittels Doublecortin (DCX)

Im zentralen Nervensystem findet man sowohl während der cerebralen Entwicklung als auch in bestimmten Zonen wie dem GD und der ZSV im adulten Alter die Ausprägung des microtubulinbindenden Proteins DCX. Dieses Phosphoprotein dient somit als Marker von proliferativen Progenitorzellen und neu gebildeten Neuroblasten. Durch die Fähigkeit zur Mikrotubuli-Bindung kennzeichnet es auch die neuronale Migration.

Die Behandlung der Hirnschnitte mit dem Antikörper Anti-DCX wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 5 Minuten
2. Sättigung unspezifischer Verbindungen mittels 3% Normal-Pferde-Serum in 0,1M PBS für 30 Minuten, direkt auf die Schnitte appliziert
3. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-DCX (1:100, polyklonaler Ziegen-Antikörper, Santa Cruz, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, Frankreich) und 3% Normal-Pferde-Serum in 0,1M PBS bei Raumtemperatur über Nacht

Fluoreszenzmikroskopische Methode

4. Am Folgetag Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten
5. Inkubation mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Ziege IgG (1:1000, entwickelt in Esel, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Asnieres, Frankreich) unter Lichtschutz bei Raumtemperatur für 2 Stunden
6. Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten unter Lichtschutz
7. Trocknung der Schnitte unter Lichtschutz
8. Eindeckelung mit Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, AbCys Vector Laboratories, Paris, Frankreich)

Die Auswertung der DCX-Fluoreszenz-Markierung erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (AW: 532nm, EW: 565, rot).

2.2.5. Doppelmarkierung mit Immunofluoreszenz

Zur besseren Charakterisierung von markierten Zellen verwendet man häufig einen zweiten immunohistochemischen Marker. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Doppelmarkierungen durchgeführt zum einen zur Identifikation des Zelltypes proliferierender (Ki67-positiver) Zellen und zum anderen zur näheren Beleuchtung des Schicksals einzelner neu gebildeter Zellen.

Vorbehandlung der Hirnschnitte

Um signifikantere Resultate durch eine bessere Penetration der Antikörper in das Gewebe zu erreichen, wurden die Schnitte mit einem Citrat-Puffer vorbehandelt. Der Citrat-Puffer wurde wie oben beschrieben zubereitet und die Schnitte gleichermaßen in der Mikrowelle gekocht.

Doppelmarkierung Ki67/GFAP

Diese Form der Doppelmarkierung dient der Identifizierung des astroglialen Anteils proliferierender (Ki67-positiver) Zellen.

Die Behandlung der Schnitte erfolgte wie die Einzelmarkierungen. Entsprechend wurden die Antikörper in aufeinander folgenden Arbeitsschritten appliziert:

1. Tag: Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Ki67 (1:200, polyklonaler Antikörper, entwickelt in Hase, NCL-Ki67p, Novocastra, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, Frankreich) und dem Antikörper Anti-GFAP-Cy3 (1:1000, Clone G-A-5, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, Frankreich)
2. Folgetag: Inkubation mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG (1:1000 entwickelt in Ziege, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, Frankreich)

Die Auswertung der Ki67/GFAP-Fluoreszenz-Doppel-Markierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (AW: 488nm, EW: 525nm, grün/AW: 532nm, EW: 565nm, rot).

Doppelmarkierung Ki67/ Nestin

Die Doppelmarkierung Ki67/Nestin kann Aufschlüsse geben über eine proliferative Aktivität noch unreifer Zellen.

Die Behandlung der Schnitte erfolgte wie die Einzelmarkierungen. Entsprechend wurden die Antikörper in aufeinander folgenden Arbeitsschritten appliziert:

1. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Ki67 (1:200, polyklonaler Antikörper, entwickelt in Kaninchen, NCL-Ki67p, Novocastra, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, Frankreich)
2. am Folgetag: Inkubation mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Kaninchen IgG (1:1000, entwickelt in Ziege, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, Frankreich)
3. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Nestin (1:200, monoklonaler Maus-

Antikörper, Clone Ratte 401, Chemicon International, Hampshire, UK)

4. am 2. Folgetag Inkubation mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Maus IgG (1:500, entwickelt in Esel, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Asnieres, Frankreich)

Die Auswertung der Ki67/Nestin-Fluoreszenz-Doppel-Markierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (AW: 488nm, EW: 565nm, grün/AW: 532nm, EW: 565nm, rot).

Doppelmarkierung DCX/Nestin

Die Doppelmarkierung von Zellen mit Nestin und DCX kann Aufschlüsse geben über den Anteil von Progenitoren mit bereits neuronalen Eigenschaften.

Die Behandlung der Schnitte erfolgte wie die Einzelmarkierungen. Entsprechend wurden die Antikörper in aufeinander folgenden Arbeitsschritten appliziert:

1. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-DCX (1:100, polyklonaler Ziegen-Antikörper, Santa Cruz, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, Frankreich)
2. am Folgetag: Inkubation mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Ziege IgG (1:1000, entwickelt in Esel, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Asnieres, Frankreich)
3. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Nestin (1:200, monoklonaler Maus-Antikörper, Clone Ratte 401, Chemicon International, Hampshire, UK)
4. am 2. Folgetag: Inkubation mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Maus IgG (1:500, entwickelt in Esel, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Asnieres, Frankreich) Waschung in 0,1M PBS für 3 mal 10 Minuten unter Lichtschutz

Die Auswertung der DCX/Nestin-Fluoreszenz-Doppel-Markierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (AW: 488nm, EW: 565nm, grün/AW: 532nm, EW: 565nm, rot).

Doppelmarkierung DCX/TUNEL

Zur genaueren Beleuchtung des Schicksals neu gebildeter (DCX-positiver) Neuroblasten wurde in einem weiteren Schritt eine TUNEL-Färbung durchgeführt um eine eventuell begrenzte Lebensdauer der Zellen mit folgendem Zelltod zu untersuchen.

Die Behandlung der Schnitte erfolgte wie die Einzelmarkierungen. Entsprechend wurden die Antikörper in aufeinander folgenden Arbeitsschritten appliziert:

1. Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-DCX (1:100, polyklonaler Ziegen-Antikörper, Santa Cruz, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, Frankreich)
2. am Folgetag: Inkubation mit einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper Anti-Ziege IgG (1:1000, entwickelt in Esel, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, Asnieres, Frankreich)
3. Vorbereitung und Applikation der TUNEL-Reaktionsmischung (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Meylan, Frankreich) wie für die Einzelmarkierung beschrieben

Auswertung der DCX/TUNEL-Fluoreszenz-Doppel-Markierung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (AW: 532nm, EW: 565nm, rot/AW: 488nm, EW: 565nm, grün).

2.3. Methoden zur Auswertung

Für alle Untersuchungen wurden Koronarschnitte in 20µm Dicke (bzw. 50µm Dicke der Schnitte zur Cresyl Violet Behandlung) auf Schnitthöhe von Bregma -3,3mm, entsprechend der Tafel 31 im Hirnatlas von Paxinos und Watson verwendet (Paxinos und Watson 1982).

Die Einteilung der Gruppen fand nach jeweiligem Alter bzw. postischämischer Überlebenszeit (Reperfusionszeit) der Tiere statt. Es wurden alle Tiere an ihrem 7. Postnataltag (PNT) operiert und gemäß der Tage, die sie darauf folgend am Leben gelassen wurden, gruppiert. So wird folgend ein Tier mit z.B. 7 Tagen Reperfusionszeit PIT7 (PIT=Postischämietag) benannt und entspricht dem Alter der Kontrolltiere von PNT14.

Mikroskopie und Fotografie

Die Auswertungen erfolgten an einem Mikroskop vom Typ Nikon Eclipse E800M (Nikon, Paris, Frankreich). Für die Fluoreszenz-Markierungen wurde eine Fluoreszenzlampe vor das Mikroskop geschaltet, wobei man sich die Fähigkeit zur Autofluoreszenz des jeweiligen sekundären Antikörpers bei entsprechender Wellenlänge zu Nutze machte.

Die Aufnahmen entstanden an einer DFC 300 FX Camera (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, Frankreich) und wurden mit Hilfe eines Leica-IM50-Programmes und des Adobe Photoshop (Version 7.0) verarbeitet.

Zur Interpretation von Doppelmarkierungen diente ein konfokales DM-IRBE Laser-Scanning-Mikroskop vom Typ Leica SP5. Die gewonnenen Photos konnten anschließend mit Hilfe

eines ImageJ Programms in den Photoshop (Version 7.0) importiert und dort bearbeitet werden.

Vermessung der Querschnittsflächen von Hirnhemisphären und Insultkavität

Die Querschnittsflächen beider Hirnhemisphären von Ischämietieren im Alter zwischen PNT 8-28 (entspricht PIT1-21) wurden in Cresyl Violet gefärbten Schnitten (Bregma -3,3mm) unter Zuhilfenahme eines computergestützten Bild-Analyse-Systems (Image Pro-Plus Version 4.1) morphometrisch vermessen und mit den Hemisphärenflächen von gesunden, gleichaltrigen Kontrolltieren verglichen. Es wurden von jeweils 4 Koronarschnitten pro Gehirn die Querschnittsflächen für jede Hemisphäre einzeln bestimmt, wobei ipsilateral (Infarktseite) die Insultkavität mit einbezogen wurde. Anschließend wurde die Querschnittsfläche der Insultkavität allein bestimmt um einen zeitlichen Verlauf ihrer Evolution aufzuzeichnen. Die Mittelwerte der gewonnenen Messdaten konnten über ein Excel-Computerprogramm ermittelt werden.

Quantifizierung von Zellen

Quantifizierungen erfolgten mittels Zellzählung bei einer 200fachen Vergrößerung, wobei TUNEL-positive Zellen in der Weißen Substanz und angrenzender Cortexschicht VI und Ki67-positive Zellen im GD und der ZSV (Bregma -3,3) sowohl ipsi- und contralateral als auch in Kontrollen gezählt wurden. Verwendung fanden Gehirne mit einer postischämischen Reperusionszeit zwischen 4h und 48h (TUNEL-Methode) bzw. zwischen 24h und 49d (Ki67-Markierung). Pro Tier wurden 3 Hirnschnitte zu je 3 Zählfenstern verwendet. Die erhobenen Daten konnten über ein Excel-Computerprogramm zu Mittelwerten zusammengefasst werden.

Statistische Analyse der erhobenen Daten

Ein computerbasiertes Statistik-Programm (Statview, Version 5.1.) wurde zur Datenanalyse genutzt. Varianzanalysen dienten dem Vergleich der ermittelten Werte der Querschnittsflächen sowie der Zellzählungen. Der Bonferroni-Post-Hoc-Test half Differenzen innerhalb der Gruppen zu evaluieren, wobei die Einteilung der Gruppen jeweils nach Alter bzw. postischämischer Überlebenszeit (Reperusionszeit) der Tiere statt fand. Generell wurden Unterschiede als signifikant betrachtet bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Läsion und Zelltod infolge cerebraler Ischämie

3.1.1. Entwicklung der Läsion in Abhängigkeit von der postischämischen Überlebenszeit

Zur Beobachtung des Schadensausmaßes bezogen auf einen gesamten Zellverband nach ischämischer Periode wurden Cresyl Violet gefärbte Hirnschnitte ausgewertet.

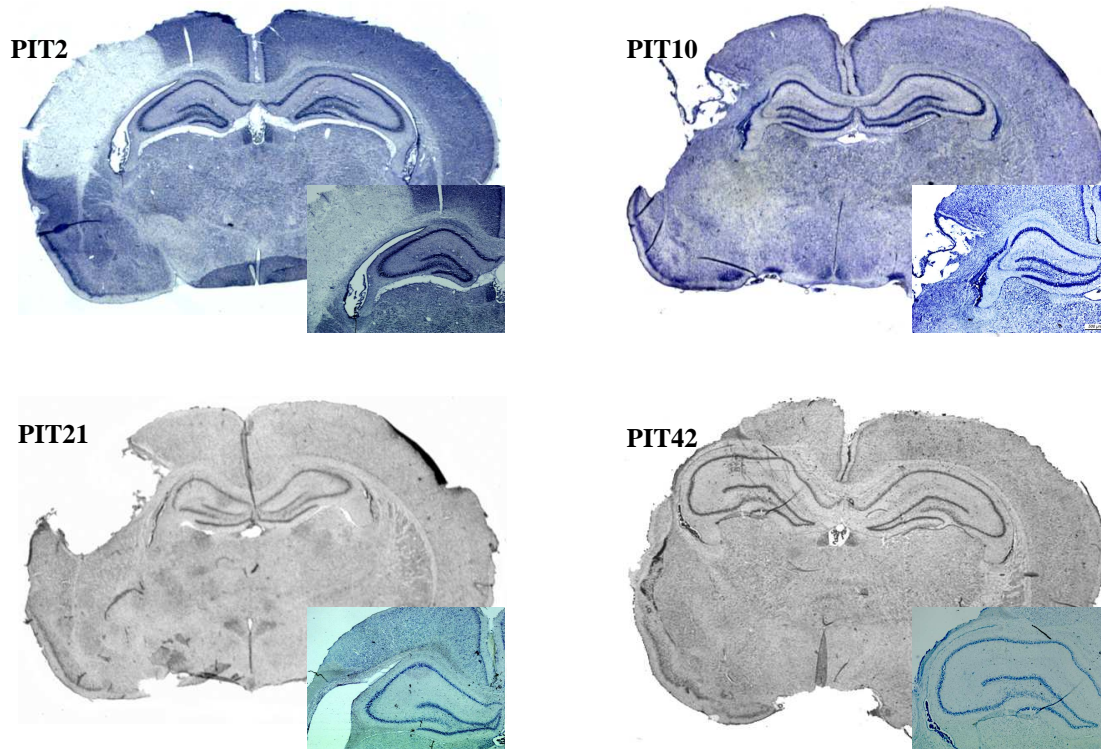
Von Interesse war die Entwicklung einer ipsilateralen Kavität in Abhängigkeit von der postischämischen Überlebenszeit.

24 bis 72 Stunden nach ischämischer Periode wurde eine deutliche Gewebeaufhellung im Einzugsgebiet der ACM sichtbar. Bereits an PIT7 zeichnete sich an der Stelle des verblassten Gewebes eine deutliche Kavität ab, die sich auch in den folgenden Tagen (PIT10, 14, 21) weiter entwickelte und schließlich zum definitiven Verlust sämtlicher kortikaler Gewebeschichten führte, wie an PIT42 zu beobachten war (Abb. 3).

Weiterhin konnte bei circa einem Drittel der untersuchten Tiere ein Verlust hippocampaler Zellen verzeichnet werden, die nicht im direkten Einzugsgebiet der MCA lagen (Abb. 4).

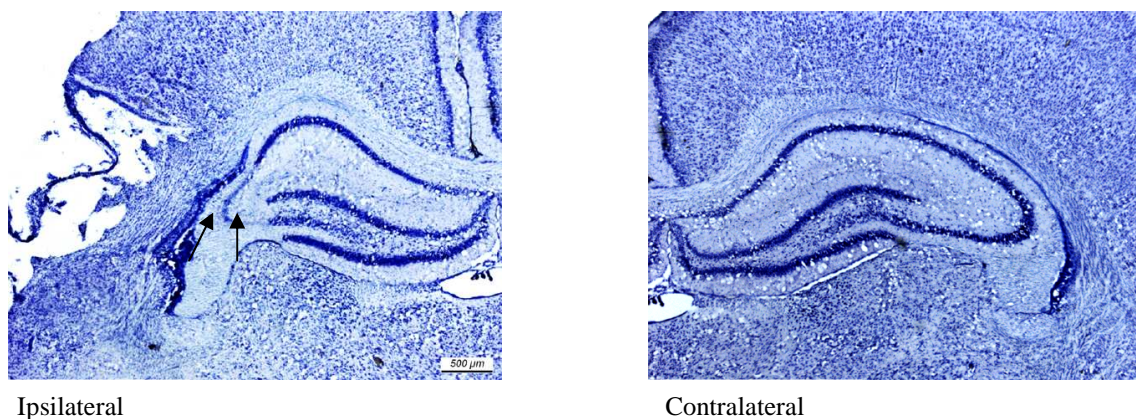
Morphometrische Messungen des Infarktgebietes ließen keine bemerkenswerte Vergrößerung der Läsion bzw. Kavität mit fortschreitender postischämischer Zeit erkennen ($p > 0,05$), (Tab. 1). Ein progressiver Verlauf wurde lediglich durch die genannten morphologischen Veränderungen der geschädigten Region sichtbar.

Abb. 3 Cresyl Violet-Färbung (MV5x) - kortikaler Gewebeverlust nach Ischämie



Abbildungen vom Gewebeschaaden in der linken ipsilateralen Hemisphäre an PIT2, 10, 21 und 42 auf Höhe des dorsalen Hippocampus (Bregma -3,3mm). Das blasse ischämische Gebiet (PIT2) entwickelt sich zu einer kortikalen Kavität (PIT10, 21 und 42).

Abb. 4 Cresyl Violet (MV20x) - Hippocampaler Zellverlust auf Distanz



Bei circa einem Drittel der Tiere kommt es zum Verlust von Zellen im Bereich der CA2-CA3- Region des Hippocampus (Pfeile), die keinen Teil des eigentlichen, vom Infarkt betroffenen Gebietes darstellt.

Tab. 1 Mittelwerte der Querschnittsflächen des kortikalen Infarktareals (Kavität)

PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	kortikales Infarktareal	
		Mittelwerte (mm ²)	Std.Abw.
1(8)	3	6.5	0.4
2(9)	3	6.3	3.0
3(10)	3	4.7	0.3
10(17)	3	5.3	1.0
14(21)	3	5.0	1.2
21(28)	3	5.7	0.8

ANOVA $p > 0.05$

3.1.2. Morphometrische Messung der Hemisphärenoberflächen

Im Mittelpunkt dieser Betrachtungen stand der Vergleich von ipsilateralen (Infarktseite einschließlich Infarktareal) versus contralaterale Hemisphärenoberflächen (Gegenseite zum Infarkt) der Ischämietiere sowie von contralateralen Hemisphärenoberflächen versus Hemisphärenoberflächen gleichaltriger Kontrolltiere, die eine ungestörte Entwicklung durchliefen.

Im Zeitraum zwischen 24h und 72h nach Läsionsinduktion konnte kein signifikanter Größenunterschied zwischen ipsilateraler (Infarktregion in Messung eingeschlossen) und contra-lateraler Hemisphäre festgestellt werden ($p > 0,05$), (Tab. 2). Allerdings mit zunehmender Überlebenszeit (Untersuchung einer Altersgruppe zwischen PIT10 und PIT21) wurde eine deutliche Flächenreduktion der Infarkt- im Vergleich zur Gegenseite ermittelt ($p < 0,01$), (Tab. 3, Abb. 5).

Tab. 2 Mittelwerte der Hemisphärenoberflächen im Vergleich ipsilateral (Infarktseite, Messung einschließlich Infarktareal) zu contralateral (Gegenseite zum Infarkt) bei früher postischämischer Altersgruppe (PIT1-3)

PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	Ipsilateral		Contralateral	
		Mittelwerte (mm ²)	Std.Abw.	Mittelwerte (mm ²)	Std.Abw.
1(8)	3	29.2	0.2	29.7	1.8
2(9)	3	29.8	0.8	31.0	3.2
3(10)	3	32.5	4.4	34.5	2.6

ANOVA $p > 0.05$

Tab. 3 Mittelwerte der Hemisphärenoberflächen im Vergleich ipsilateral (Infarktseite, Messung einschließlich Infarktareal) zu contralateral (Gegenseite zum Infarkt) bei später postischämischer Altersgruppe (PIT10-21)

PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	Ipsilateral		Contralateral	
		Mittelwerte (mm ²)	Std. Abw.	Mittelwerte (mm ²)	Std. Abw.
10(17)	3	41.2	3.2	50.4	5.3
14(21)	3	40.7	5.7	48.2	4.8
21(28)	3	44.1	2.9	52.3	3.6

ANOVA $p < 0.01$

Der Vergleich der mittleren Oberflächen der contralateralen Hemisphären von Ischämietieren zu den von gleichaltrigen Kontrolltieren erzielte ein unerwartetes Ergebnis. Im frühen postischämischen Stadium zwischen PIT1 und PIT3 konnte eine Verminderung auch der contralateralen Hirnhälfte ermittelt werden ($p < 0,05$), (Tab. 4). Jedoch bei Tieren fortgeschrittenen Alters, beginnend 10Tage nach Läsionsinduktion (PIT10) konnte nicht mehr von einem signifikanten Größenunterschied gesprochen werden. Tiere, die am 10., 14. oder 21. PIT getötet wurden, waren im contralateralen Flächenverhältnis nahezu identisch zu den Kontrolltieren im entsprechenden Alter ($p > 0,05$), (Tab. 5, Abb. 5).

Tab. 4 Mittelwerte der contralateralen Hemisphärenoberflächen (Gegenseite zum Infarkt) von Ischämietieren im Vergleich zu Kontrolltieren bei früher Altersgruppe (PNT8-10)

PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	Ischämietier contralateral		Kontrolltier	
		Mittelwerte (mm ²)	Std. Abw.	Mittelwerte (mm ²)	Std. Abw.
1 (8)	3	29.7	1.8	35.6	1.9
2 (9)	3	31.0	3.2	35.0	4.4
3 (10)	3	34.5	2.6	41.0	6.0

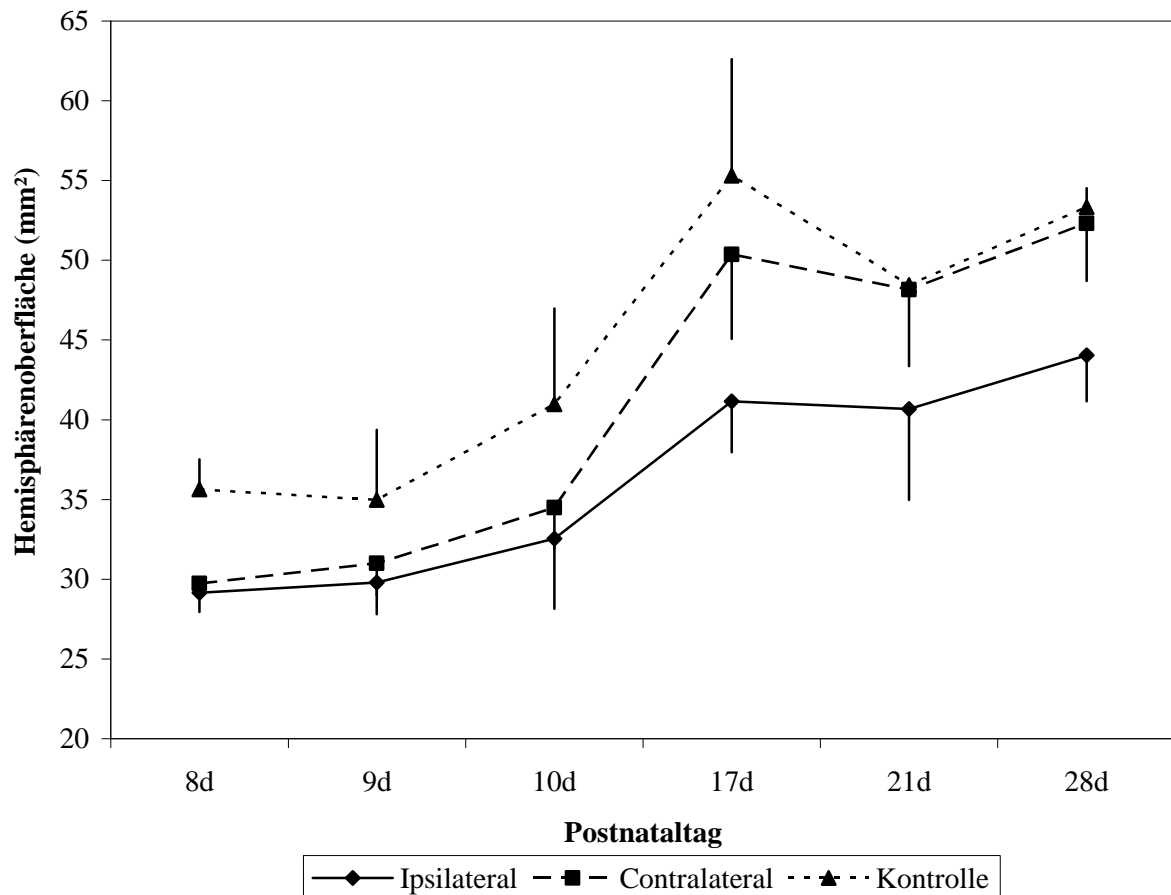
ANOVA $p < 0.05$

Tab. 5 Mittelwerte der contralateralen Hemisphärenflächen (Gegenseite zum Infarkt) von Ischämietieren im Vergleich zu Kontrolltieren bei später Altersgruppe

PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	Ischämietier contralateral		Kontrolltier	
		Mittelwerte (mm ²)	Std.Abw.	Mittelwerte (mm ²)	Std.Abw.
10 (17)	3	50.4	5.3	55.3	7.3
14 (21)	3	48.2	4.8	48.4	0.4
21 (28)	3	52.3	3.6	53.3	1.2

ANOVA $p > 0.05$

Abb. 5 Graphische Darstellung der Mittelwerte von Hemisphärenoberflächen



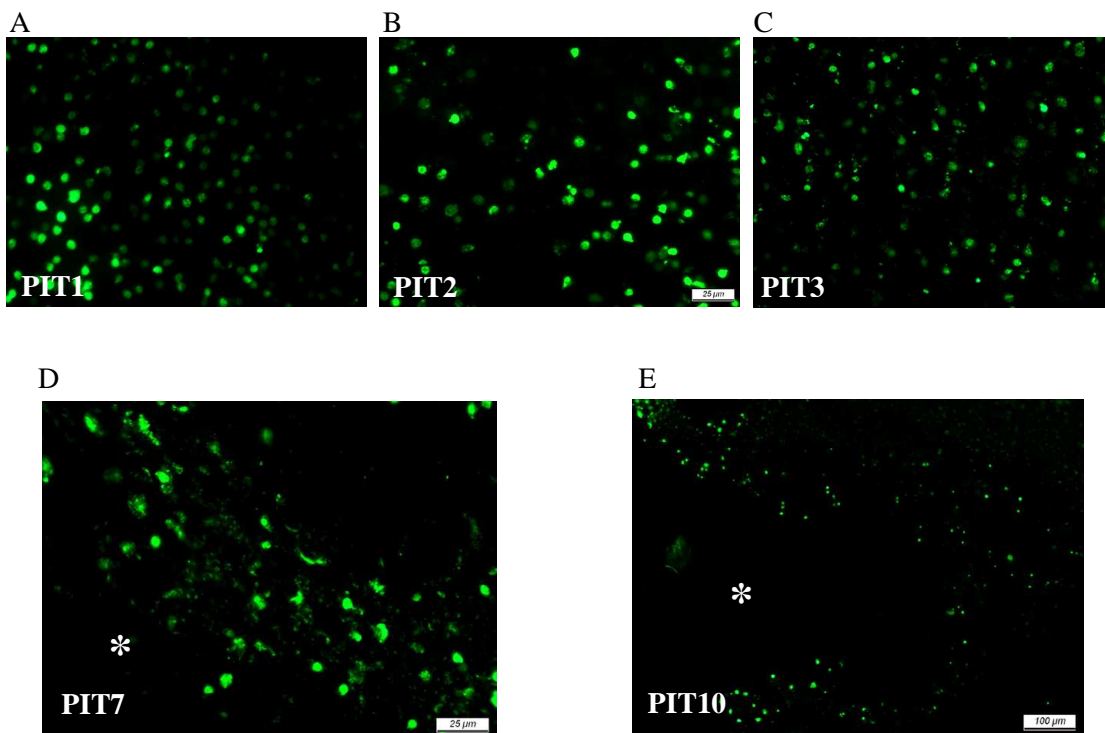
Graphische Darstellung der Hemisphärenoberflächen-Mittelwerte von Ischämietieren (ipsilateral - Infarktseite, contralateral - Infarktgegensseite) und von gleichaltrigen Kontrolltieren in Abhängigkeit zur postnatalen Überlebenszeit (PNT8-28 [PIT1-21]), Angabe der Varianz als \pm Std.Abw. (pro mm²). Die Messungen erfolgten in Cresyl Violet gefärbten Schnitten (Bregma -3,3mm).

3.1.3. Visualisierung des einzelnen Zelltodes

Mit Hilfe der TUNEL-Methode wurde der einzelne Zelltod in Folge ischämischen Einflusses näher betrachtet. Im direkten Einzugsgebiet der Arteria cerebri media konnte auch (wie bereits zuvor mit der Cresyl Violet-Methode beschrieben) ein progressiver Verlauf bezüglich absterbender Zellen verzeichnet werden.

Beginnend 12h nach Ischämie konnten erste TUNEL-positive Zellen im parietalen Cortex entdeckt werden. Vor allem im Stadium zwischen PIT1 und PIT3 sah man im Bereich der Läsion (entsprechend dem Versorgungsgebiet der ACM) eine extrem hohe Dichte von „apoptotic-bodies“. Bereits am 7. PIT war nur noch ein Band TUNEL-positiver Zellen zu erkennen, welches sich an der Grenze zwischen entstehender Kavität und restlicher Hemisphäre befand. Mit fortschreitender postischämischer Zeit verschmälerte sich dieses Grenzband apoptotischer Zellen weiter bis nur noch ein gewebefreier Raum, die vollständig entwickelte Kavität, übrig blieb (Abb. 6).

Abb. 6 TUNEL-assay (MV400x [A-D], 100x [E]) - Zelltod im Läsionsgebiet



* Kavität

Darstellung TUNEL-positiver Zellkerne (grün) im parietalen Cortex (Bregma -3,3mm) zwischen PIT1-10. Beobachtung des apoptotischen Zelltodes überwiegend zwischen PIT1-3 (A-C). Zwischen PIT7-10 beginnende Formation der Insult-Kavität, es verbleibt ein sich zunehmend verschmälernendes Band apoptotischer Zellen in den unteren Cortex-Schichten (D,E).

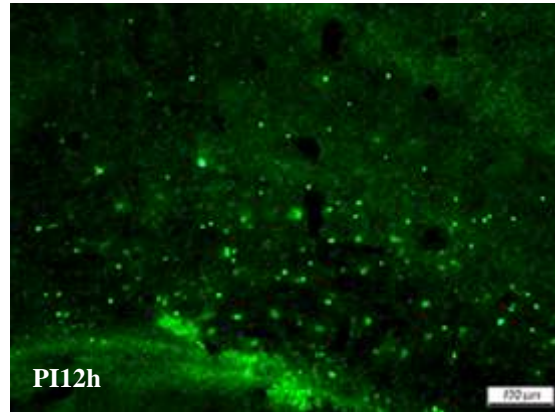
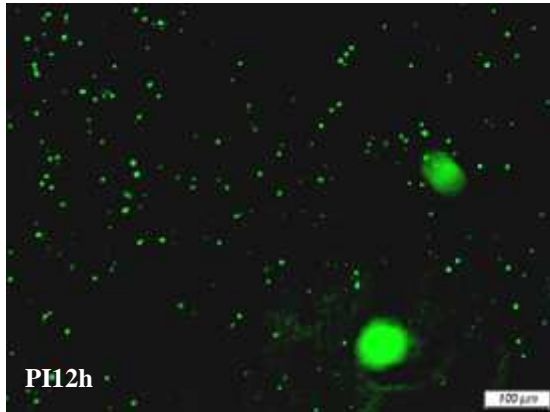
Im Bereich der restlichen ipsilateralen Hemisphäre (außerhalb des direkten Läsionsgebietes) sowie der contralateralen konnten ab PIT1 (außer bei einigen Tieren vereinzelt) kaum absterbende Zellen entdeckt werden. Deshalb wurden Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten eingeleitet. Der Zeitraum unmittelbar nach Läsionsinduktion (4h, 12h und 18h) ließ einen ausgedehnten beidseitigen Zelltod hauptsächlich in der weißen Substanz, aber auch im Bereich von Striatum und Hippocampus erkennen. Insbesondere in der Periode zwischen 4h und 12h wurde in beiden Hirnhälften ein nahezu gleich verteilter apoptotischer Zelltod verzeichnet. Zwischen 12h und 18h nach Ischämie wurde bei mehreren Tieren ein dünnes Band TUNEL-positiver Zellen in den obersten Cortexschichten sichtbar (Abb. 7 A-C).

Abb. 7 TUNEL-assay (MV100x (A,B), 200x (C))- früher ausgedehnter Zelltod in den Hemisphären

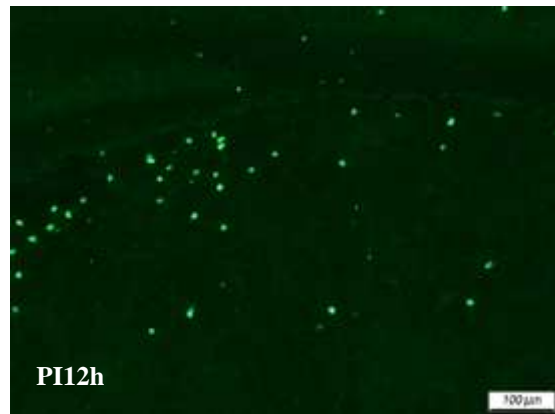
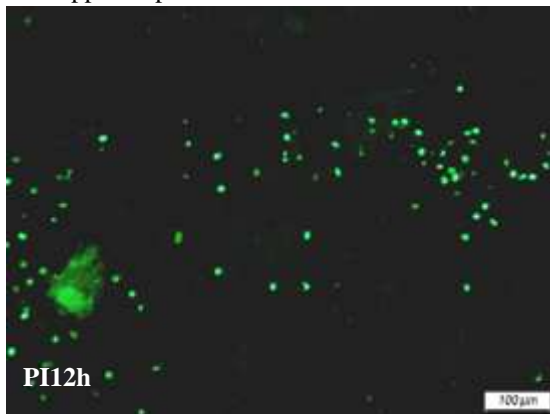
Ipsilateral

Contralateral

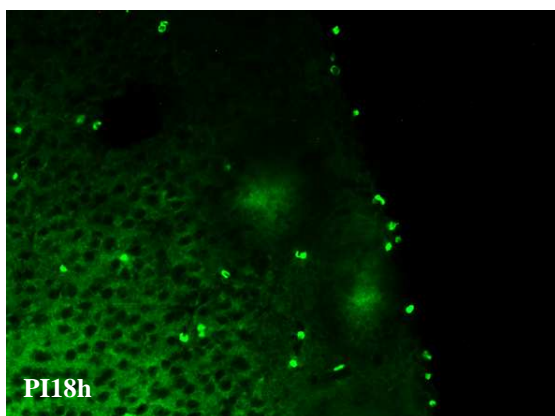
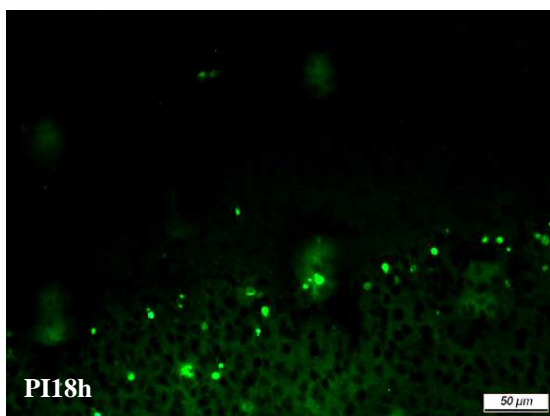
A Weisse Substanz



B Hippocampus



C Obere Cortexschichten



Darstellung TUNEL-positiver Zellkerne (grün) zu frühen postischämischen Zeitpunkten mit ausgedehnter, diffuser Verteilung in beiden Hemisphären (A-C).

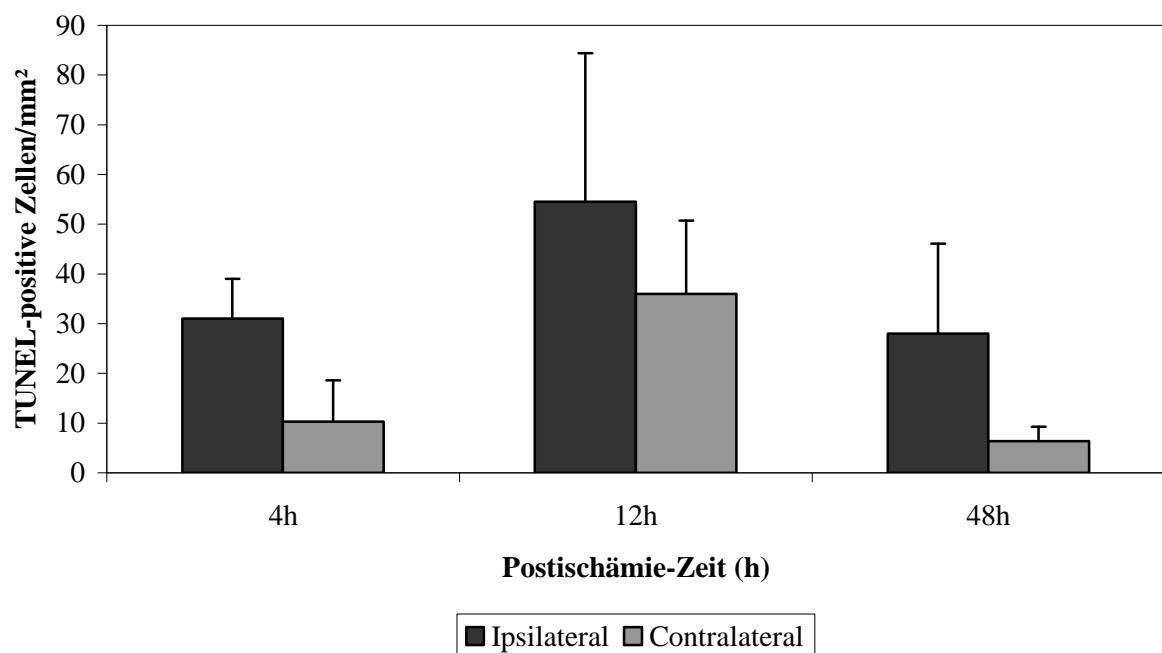
Quantifizierungen von TUNEL-positiven Zellen in der Weißen Substanz und angrenzender Cortexschicht VI im unmittelbaren postischämischen Zeitraum belegten einen nahezu in gleichem Maße beidseitig auftretenden Zelltod. Statistische Tests (ANOVA) zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Weißen Substanz/Cortexschicht VI zwischen ipsi- und contralateral (zu 4h, 12h, 48h $p>0,05$).

Es wurde sichtbar, dass apoptotische Vorgänge zum frühen Zeitpunkt PI12h beidseits bedeutender waren im Vergleich zu PI48h (PIT2). Contralateral konnte ein statistisch hoch signifikantes Ergebnis beobachtet werden (contra 12h vs. 48h $p<0,01$) während ipsilateral kein signifikantes Resultat ermittelt wurde (ipsi 12h vs. 48h $p<0,08$). Jedoch lag die ermittelte Zellzahl zu PI12h deutlich höher als zu PI48h (Tab. 6/Abb. 8).

Tab. 6 Mittelwerte TUNEL-positiver Zellen in der Weißen Substanz und Cortexschicht IV in Ischämietieren

PI (Zeit in h)	Anzahl der Tiere	Ipsilateral		Contralateral	
		Mittelwerte (Zellzahl/mm ²)	Std.Abw.	Mittelwerte (Zellzahl/mm ²)	Std.Abw.
4	5	31.0	8.0	10.3	8.3
12	5	54.5	29.9	36.0	14.7
48	5	28.0	18.1	6.4	2.9

Abb. 8 Graphische Darstellung der Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen



Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen/mm² in der Weißen Substanz und angrenzender Cortexschicht VI in ipsi- und contralateralen Hemisphären (Bregma -3,3mm) zwischen PI4-48h, Angabe der Varianz als +/- Std.Abw.

3.2. Reaktion von Glia- und Progenitorzellen auf cerebrale Ischämie

3.2.1. Vermehrtes Vorkommen von Astrozyten

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) findet man im zentralen Nervensystem als cytoplasmatisches Intermediärfilament in Astrozyten. Die Markierung von Astrozyten sollte Aufschluss geben über die gliale Antwort auf ischämische Hirnläsion sowie ihr möglicherweise verändertes Vorkommen in ZSV und GD. Gegenstand der Untersuchung waren Hirnschnitte von Tieren, die im Alter von PIT2, 7 und 28 getötet wurden. Es handelt sich hierbei um die Zeitpunkte der mit Hilfe von Anti-Ki67 ermittelten Proliferationsmaxima (Kapitel 3.3.1.).

Im direkten Grenzgebiet zur Läsion wurde 2 Tage nach Ischämie-Induktion eine große Fülle GFAP-positiver Zellen sichtbar. Ihre Zellkörper waren prall-hypertroph und ihre Prolongationen stark verkürzt. Generell konnte eine erhöhte Immunoreaktivität wahrgenommen werden, die mit wachsender Entfernung vom Läsionsgebiet allmählich abflaute. Die Betrachtung derselben Region zu PIT7 ließ noch immer zahlreiche markierte Astrozyten erkennen, die jedoch morphologische Unterschiede aufwiesen. Sie hatten nun lange Fortsätze und kleine unscheinbare Zellkörper.

Zum Zeitpunkt PIT28 waren markierte Zellen in Form eines dichten Randsaumes um die nun entstandene Kavität vertreten. Sie erschienen regelmäßig geformt und besaßen zarte dendritische Verlängerungen (Abb. 9).

In der ipsilateralen ZSV zeigte sich zu PIT2 eine ähnliche Darstellung markierter Zellen wie am Rande zum geschädigten Gewebe. Die Astrozyten wiesen die typischen bereits beschriebenen Anzeichen erhöhter Reaktivität auf. Die contralaterale ZSV hingegen prägte eine geringere Anzahl GFAP-positiver Zellen aus, die nun lange Prolongationen besaßen. Die Kontrolltiere waren ebenfalls reich an Astrozyten, allerdings unterschieden sie sich morphologisch. Sie waren feingliedrig und spinnenartig verzweigt.

Auch 7 Tage nach Ischämie wurden zahlreiche markierte Zellen bei allen untersuchten Tiergruppen gefunden. Auffallend waren ihre langen, feinen Fortsätze, die sich scheinbar zu einem dichten Netzwerk zusammenschlossen (Abb. 10).

An PIT28 sah man ipsilateral lange, hauchdünne Filamente, die nur noch eine geringe GFAP-Immunoreaktivität aufwiesen. Hingegen fand man contralateral nicht allein eine Hervorhebung der Filamente, sondern noch immer einige markierte Zellkörper (Abb. 11).

Im GD des PIT2-Tieres erschienen ipsilateral ebenfalls zahlreiche hypertrophe Astrozyten mit jedoch weniger verkürzten Prolongationen als für das Infarktgrenzgebiet beschrieben. Auch auf der contralateralen Seite wurden markierte Zellkörper identifiziert. Diese Astrozyten zeigten teilweise spiralig verkürzte Fortsätze sowie etwas weniger immunoreaktive Rumpfe als ipsilateral.

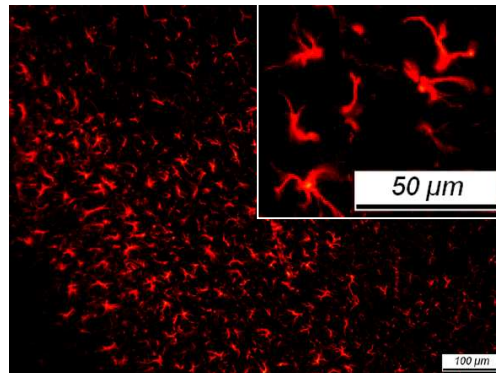
Die PIT2-Kontrollgruppe (PNT9) zeigte ebenso markierte Zellkörper und feine Prolongationen. Quantitativ wurden jedoch weniger gekennzeichnete Zellen angetroffen als bei der Ischämiegruppe.

Am 7. postischämischen Tag wurde im läsionsseitigen GD eine verminderte Anzahl GFAP-positiver Zellen ermittelt. Ihre Fortsätze waren nun länger und ihre Körper kaum noch erkennbar. Auch auf der Gegenseite wurden nur noch wenige Astrozyten gefunden. Sie glichen in ihrem morphologischen Bild dem des GD von Kontrolltieren, waren also spinnenartig, feingliedrig verzweigt (Abb. 12).

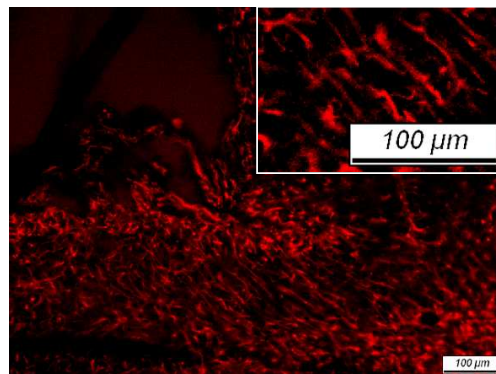
Vier Wochen nach Ischämie zeigten sich beidseitig kaum noch markierte Astrozyten. Es blieben lediglich vereinzelte filamentöse Verlängerungen identifizierbar.

Abb. 9 Astroglia mit GFAP-Markierung (MV100x) - Läsion und Grenzgebiet

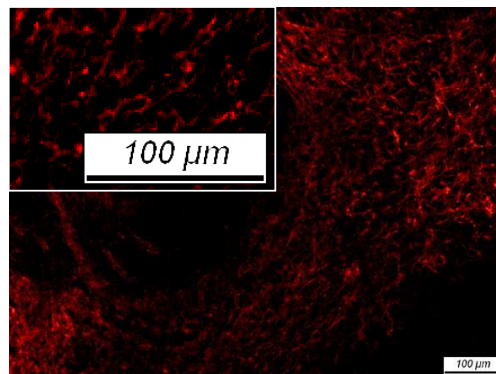
PIT2



PIT7



PIT28

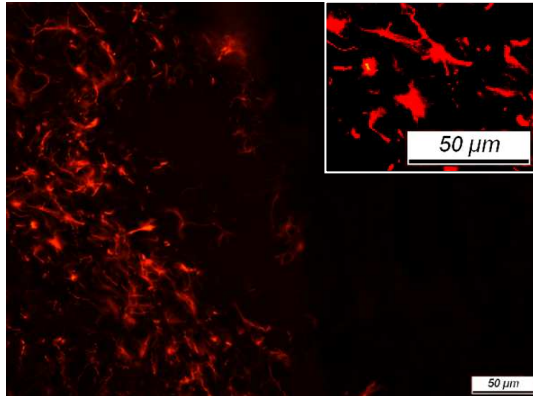


Darstellung GFAP-Fluoreszenz-markierter Astrozyten (rot) im kortikalen Läsionsgebiet von Ischämietieren (Bregma -3,3mm). Astrozyten in hochreaktivem Zustand mit verkürzten Prolongationen (PIT2), mit abklingender Immuno-reaktivität (PIT7) sowie im Ruhezustand mit zarten, dünnen Prolongationen (PIT28).

Abb. 10 Astroglia mit GFAP-Markierung (MV200x) - ZSV

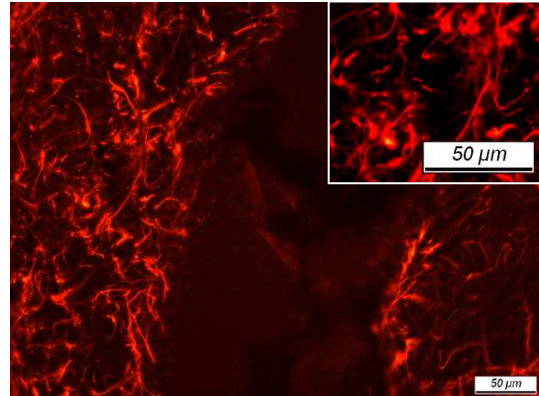
PIT2

Ipsilateral

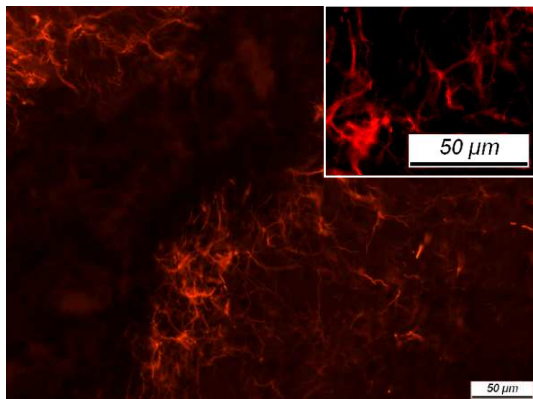


PIT7

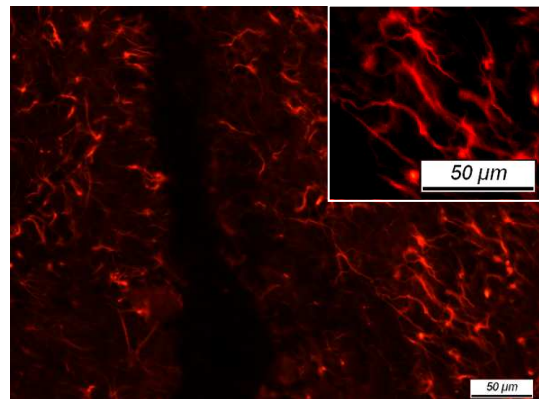
Ipsilateral



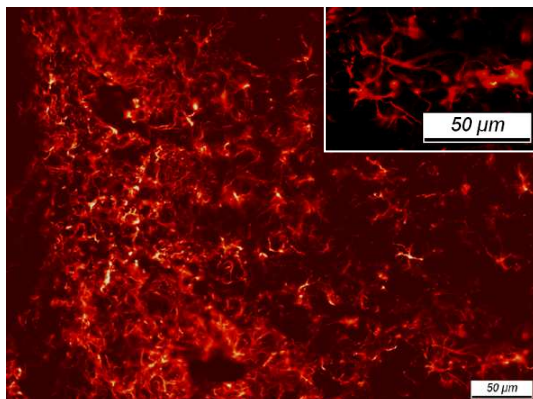
Contralateral



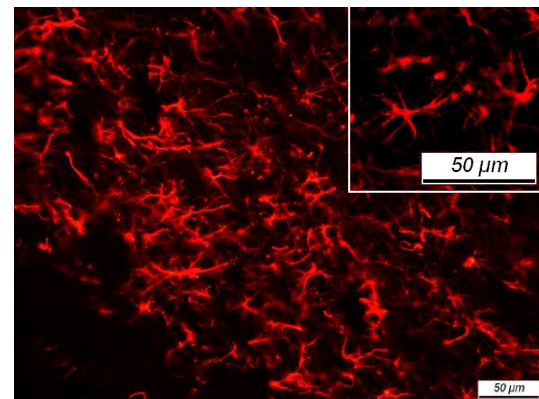
Contralateral



Kontrolle



Kontrolle

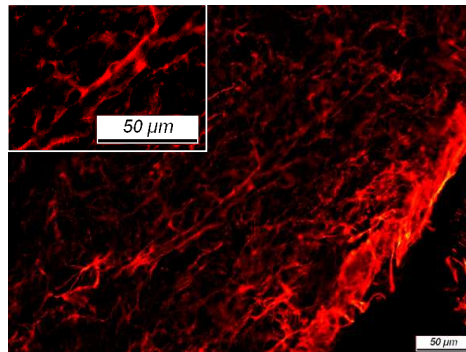


Darstellung GFAP-Fluoreszenz-markierter Astrozyten (rot) in der ZSV von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT2 wurden Astrozyten ipsilateral in hochreaktivem Zustand mit verkürzten Prolongationen, contralateral mit langen Fortsätzen und in Kontrolltieren mit feingliedrigen, spinnenartigen Fortsätzen gefunden. An PIT7 waren in allen untersuchten Tiergruppen zahlreiche GFAP-positive Zellen mit langen, feinen Fortsätzen sichtbar.

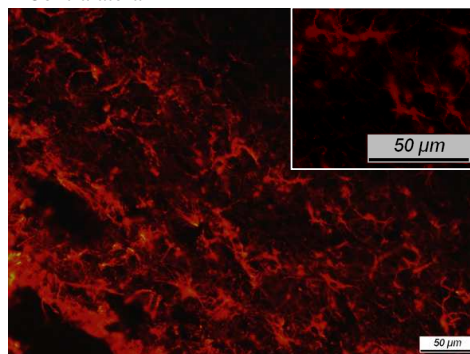
Abb. 11 Astroglia mit GFAP-Markierung (MV200x) - ZSV

PIT28

Ipsilateral



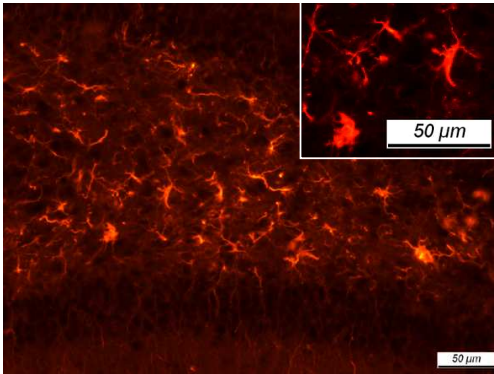
Contralateral



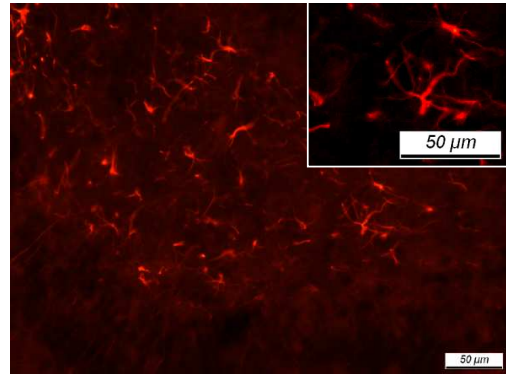
Darstellung GFAP-Fluoreszenz-markierter Astrozyten (rot) in der ZSV (Bregma -3,3mm) von Ischämietieren zu PIT28. Sowohl ipsi- als auch contralateral findet man lange, hauchdünne Filamente mit nun insgesamt verminderter Immunoreaktivität.

Abb. 12 Astroglia mit GFAP-Markierung (MV200x) - GD

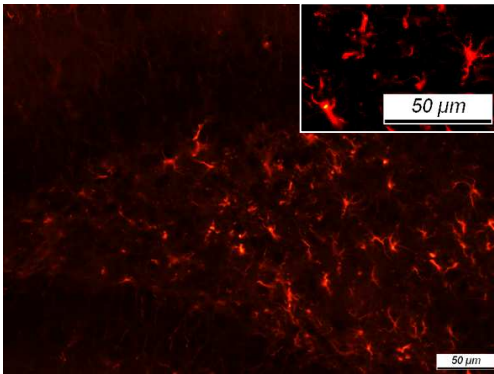
PIT2
Ipsilateral



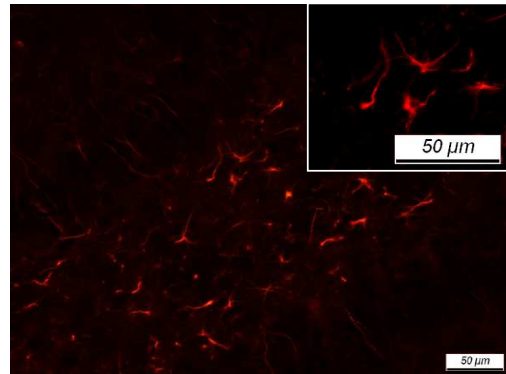
PIT7
Ipsilateral



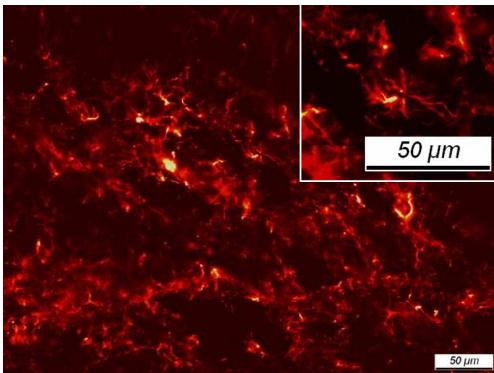
Contralateral



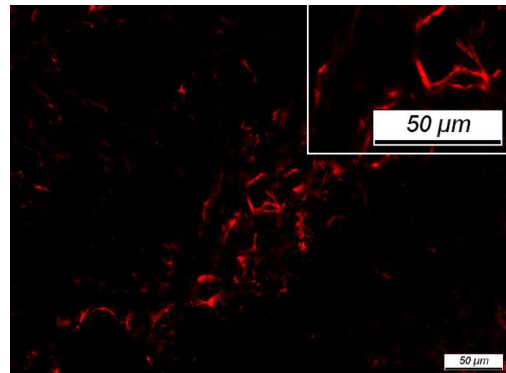
Contralateral



Kontrolle



Kontrolle



Darstellung GFAP-Fluoreszenz-markierter Astrozyten (rot) im GD (Bregma -3,3mm) von Ischämie- und Kontrolltieren. An PIT2 waren ipsilateral und contralateral immunoreaktive Astrozyten erkennbar. In der Kontrollgruppe waren die markierten Zellen mit feinen Fortsätzen versehen. An PIT7 waren in den untersuchten Gruppen weniger markierte Zellen sichtbar und zeigten nun alle eine spinnenartige, feingliedrige Verzweigung.

3.2.2. Vermehrtes Vorkommen von neuroepithelialen Stammzellen

Das Intermediärfilament Nestin wird hauptsächlich von noch undifferenzierten neuroepithelialen Stammzellen exprimiert und dient hier der Markierung eines möglicherweise veränderten Vorkommens unreifer Zellen nach Ischämie.

Gegenstand der Untersuchung waren Hirnschnitte von Tieren, die im Alter von PIT2 und 7 getötet wurden. Es handelt sich hierbei um die Zeitpunkte der mit Hilfe von Anti-Ki67 ermittelten Proliferationsmaxima (Kapitel 3.3.1.). Die Nestin-Einfachmarkierung zeigte bei der Ischämie- im Vergleich zur Kontrollgruppe vor allem deutliche morphologische Unterschiede.

Insbesondere im unmittelbaren Randgebiet zur Läsion waren zu PIT2 große Mengen Nestin-positiver Zellen mit kurzen, dicken dendritischen Verlängerungen zu entdecken, die eine Grenzlinie zum geschädigten Gewebe errichteten. Zu PIT7 fand man noch immer eine Markierung zahlreicher Zellfilamente, die nun aber wesentlich länger waren als fünf Tage zuvor (Abb. 13).

Nach PIT2 (PNT9) wurden im gesamten Bereich der ZSV aller untersuchten Tiere Nestin-positive Zellen gefunden. Bei Ischämietieren fielen bei den markierten Strukturen ipsilateral die kurzen, dicken Prolongationen auf. Sie schienen degenerativer Natur, da sie teilweise wie abgeschnitten und völlig asymmetrisch waren. Die contralaterale Seite zeigte weniger, jedoch längere, dünnere Filamente und ähnelte so dem Bild von Kontrolltieren. Nestin-beinhaltende Zellen der Kontrollen waren durch extrem lange, hauchdünne Prolongationen gekennzeichnet, welche den Charakter radiärer Glia indizierten.

Am 7. postischämischen Tag bestand noch immer ein hoher Nestin-positiver Zellanteil in der ipsilateralen ZSV. Hier war nun auch das Cytoplasma einzelner Zellen gekennzeichnet, sowie längere Filamente, die zentriert in Richtung der Läsion wiesen. Die Gegenseite sowie die ZSV der Kontrollgruppe waren jedoch nahezu frei von Markierung. Im Bereich der Läsion zeigten sich die Nestinfilamente von einer beinahe das gesamte Gebiet überdeckenden spinnennetzartigen Struktur (Abb. 14).

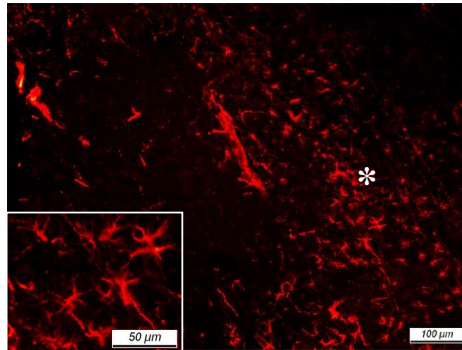
Im Gyrus dentatus zu PIT2 (PNT9) wurden ipsi- und contralateral sowie bei den Kontrollen zahlreiche teils sternförmige, teils aus langen Prolongationen bestehende Zellen gefunden (Abb. 15).

Zum Zeitpunkt PIT7 waren im Umfeld des GD bei keinem der untersuchten Tiere markierte

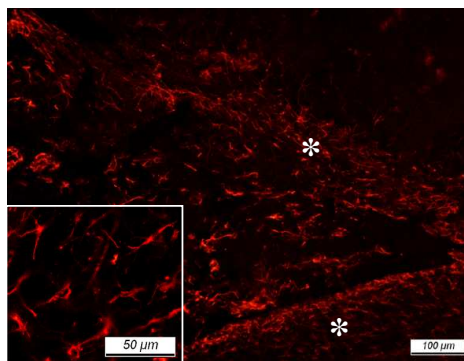
Strukturen sichtbar (nicht abgebildet).

Abb. 13 Neuroepitheliale Stammzellen mit Nestin-Markierung (MV100x)
- Läsion und Grenzgebiet

PIT2



PIT7

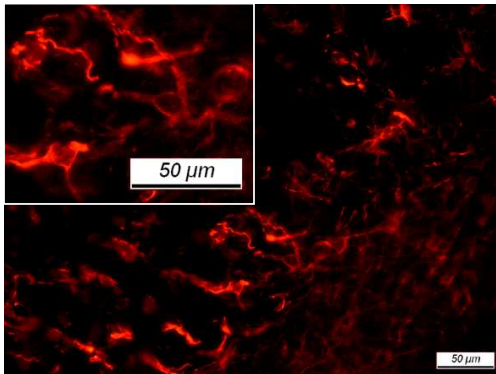


Darstellung Nestin-Fluoreszenz-markierter Zellen (rot) im kortikalen Grenzgebiet zur Läsion (Bregma -3,3mm) von Ischämietieren. Erkennbar sind Zellen mit kurzen, dicken Prolongationen, die grenzlinienartig zum Läsionsgebiet (Stern) angeordnet sind (PIT2) und Zellen mit langen, dünnen Zellfilamenten (PIT7).

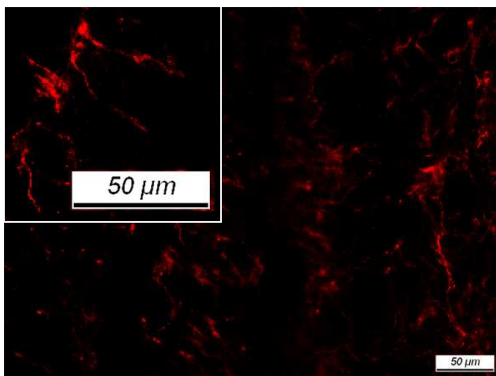
Abb. 14 Neuroepitheliale Stammzellen mit Nestin-Markierung (MV200x) - ZSV

PIT2

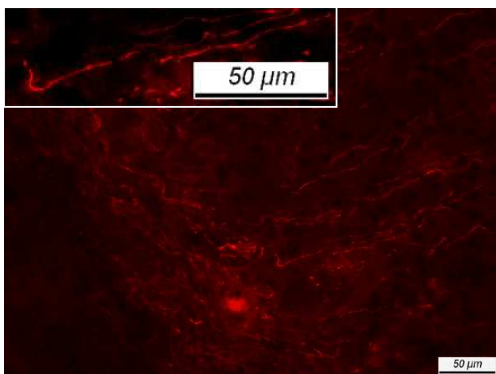
Ipsilateral



Contralateral

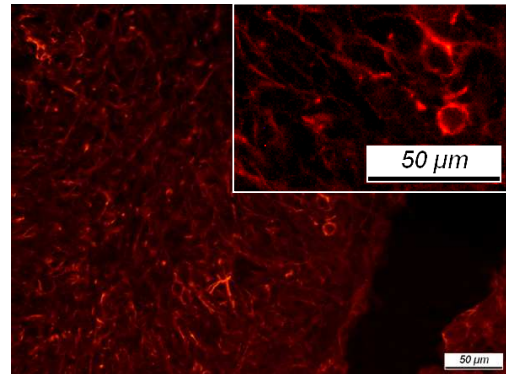


Kontrolle

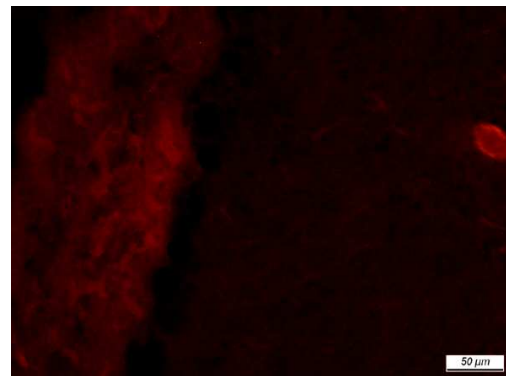


PIT7

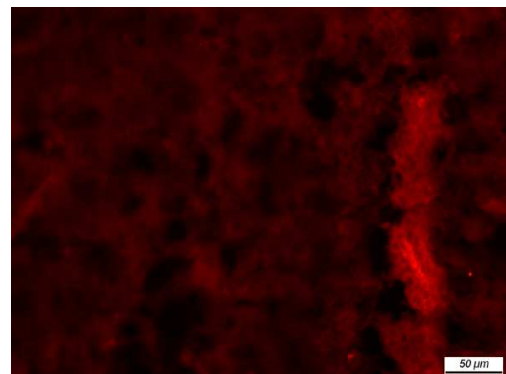
Ipsilateral



Contralateral



Kontrolle

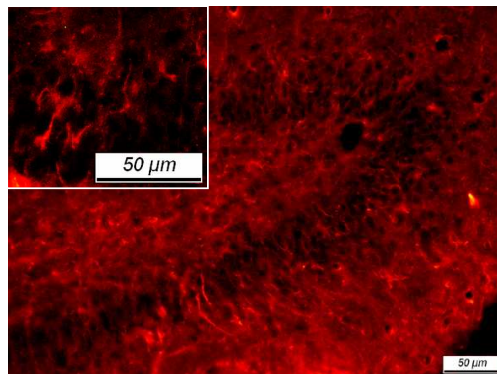


Darstellung Nestin-Fluoreszenz-markierter Zellen (rot) in der ZSV (Bregma -3,3mm) von Ischämie- und Kontrolltieren. An PIT2 konnte in allen untersuchten Gruppen Nestin-positive Zellen nachgewiesen werden. Ipsilateral waren die markierten Filamente kurz, verdickt und teilweise korkenzieherartig gewunden, contralateral waren sie länger, dünner und ähnelten dem Bild von Kontrolltieren. An PIT7 konnten nur noch in der ipsilateralen ZSV nun längere Filamente und teilweise siegelringartige cytoplasmatische Markierungen nachgewiesen werden.

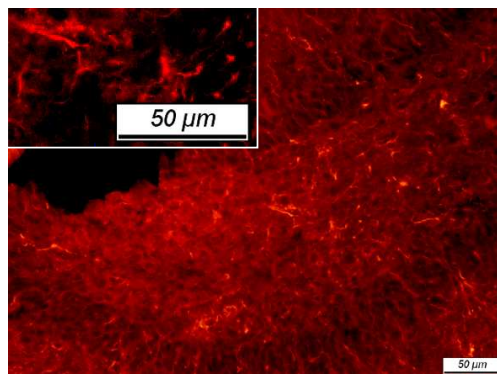
Abb. 15 Neuroepitheliale Stammzellen mit Nestin-Markierung (MV200x) - GD

PIT2

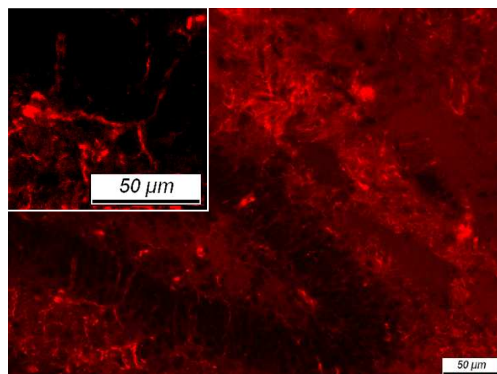
Ipsilateral



Contralateral



Kontrolle



Darstellung Nestin-Fluoreszenz-markierter Zellen (rot) im GD (Bregma -3,3mm) von Ischämie- und Kontrolltieren. An PIT2 waren in allen untersuchten Gruppen teils sternförmige, teils langprolongierte Zellfilamente sichtbar.

3.3. Proliferation, Neurogenese und Migration nach cerebraler Ischämie

3.3.1. Quantifizierung proliferierender Zellen in ZSV und GD

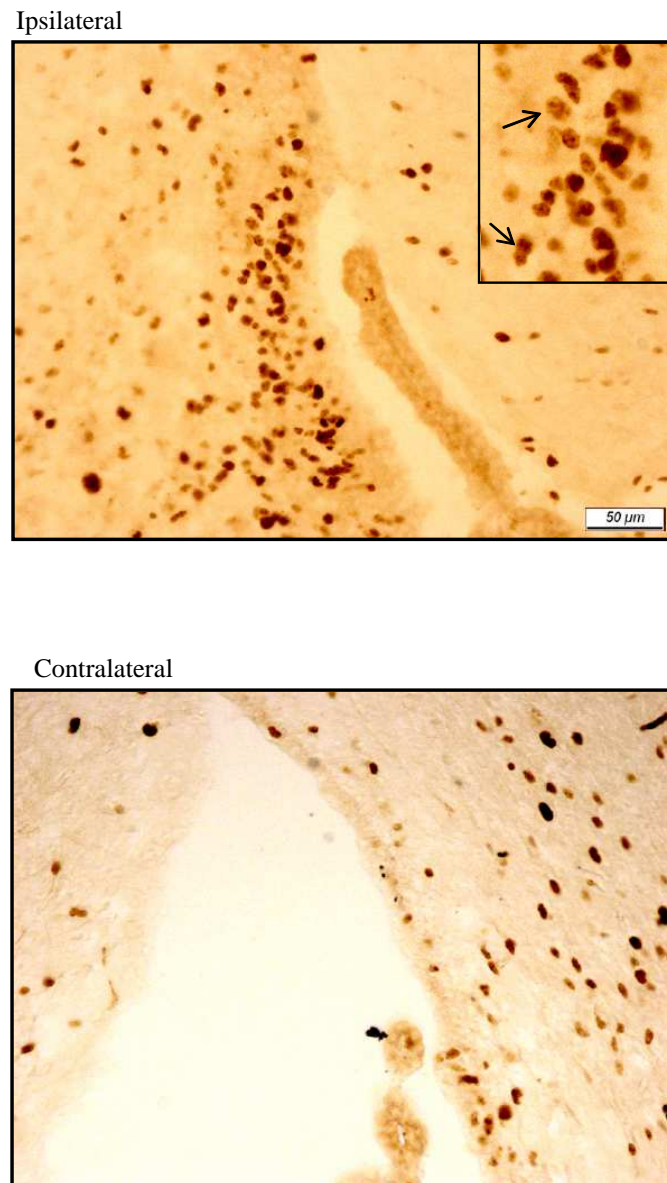
Zur Untersuchung zellulärer Proliferation wurden Hirnschnitte mit dem Mitosemarker Anti-Ki67 behandelt. Sowohl die mikroskopische Betrachtung als auch die statistische Zellquantifizierung ergaben folgend beschriebene Resultate.

Die Untersuchung der ZSV zeigte deutliche Proliferationsmaxima. An PIT2 (PNT9) stieg die Zahl Ki67-positiver Zellen deutlich an und fiel am Folgetag (PNT10) auf ein Minimum ab. Im Gegensatz zum GD konnte in der ZSV ein zweites deutliches Maximum am 7. Tag nach Läsionsinduktion (PNT14) verzeichnet werden. Ein 3. Maximum kam an PIT28 (PNT35) zustande (für PNT9, 14, 28 Ipsilateral versus Kontrolle $p < 0,05$). Zu allen Zeitpunkten der Maxima verliefen die ipsi- und contralateralen Kurven parallel zueinander, wobei die Zahl Ki67-positiver Zellen contralateral stets unter dem ipsilateralen Niveau lag (für PNT9, 14, 28 Ipsi- versus Contralateral $p < 0,05$). Auch in der ZSV junger Kontrolltiere wurden proliferative Vorgänge sichtbar. So verlief ihr Graph im Zeitraum PNT8 bis PNT10 nahezu identisch zum contralateralen (für PNT8-10 Contralateral versus Kontrolle $p > 0,05$), doch zu späteren Zeitpunkten fiel er kontinuierlich ab (für PNT14-49 Contralateral versus Kontrolle $p < 0,05$), (Tab. 7, Abb. 16 und 18A).

Tab. 7 Mittelwerte Ki67-positiver Zellen in der ipsi- und contralateralen ZSV von Ischämietieren

PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	Ipsilateral		Contralateral	
		Mittelwerte (Zellzahl)	Std.Abw.	Mittelwerte (Zellzahl)	Std.Abw.
1(8)	4	18.6	2.9	12.3	3.4
2(9)	4	26.0	6.5	17.5	4.9
3(10)	4	12.2	5.8	10.2	2.3
7(14)	3	25.9	5.9	19.4	4.6
10(17)	4	16.6	3.5	11.7	0.4
14(21)	3	12.9	2.8	9.9	0.6
21(28)	3	14.1	2.2	12.9	1.3
28(35)	2	18.8	3.2	13.9	4.4
42(49)	2	12.3	3.4	10.8	5.2

Abb. 16 Proliferierende Zellen mit Ki67- Markierung (MV200x)- ZSV
PIT2



Darstellung proliferierender Zellen mittels immunhistochemischer Markierung des mitotischen Kernproteins Ki67 in der ZSV (Bregma-3,3mm) von Ischämietieren. An PIT2 sind zahlreiche proliferierende Zellen sowohl ipsi- als auch contralateral zu verzeichnen. Die Bildvergrößerung zeigt typische Stadien der Mitose wie Chromatinkondensation und Zellteilungen (Pfeile).

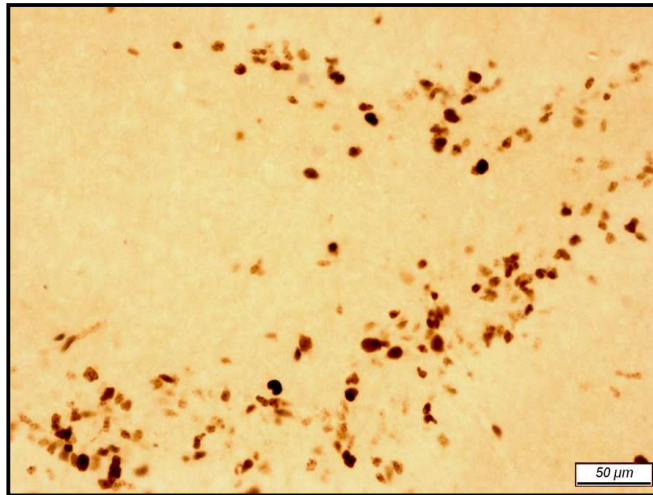
Im Bereich des GD konnte im Zeitraum zwischen PIT1 und PIT2 (PNT8 und PNT9) ein erheblicher Anstieg Ki67-positiver Zellen sowohl ipsi- als auch contralateral vermerkt werden (für PNT9 Ipsilateral/Contralateral versus Kontrolle $p<0,05$). Diesem Anstieg folgte jedoch auch hier ein beidseitiger Abfall am 3. PIT (PNT10). Hauptsächlich auf der Läsionsseite waren nochmalige, jedoch leichtere Proliferationserhöhungen am 7.Tag (PNT14) und nach PIT28 (PNT35) erkennbar (Ipsilateral/Contralateral versus Kontrolle $p<0,05$). Im Wesentlichen schien die Zahl proliferierender Zellen ab PIT14 (PNT21) konstant zu bleiben, um dann allmählich nach PIT42 (PNT49) sich dem niedrigen Niveau gleichaltriger Kontrolltiere anzugleichen. Im GD der untersuchten Kontrollgruppe konnte nur im Alter von PNT8 bis PNT9 eine erhöhte Proliferation festgestellt werden, die sich mit fortschreitendem Alter mehr und mehr verringerte und schliesslich auf den Nullpunkt absank (für PNT49 Ipsilateral/Contralateral versus Kontrolle $p>0,05$), (siehe Tab.8/Abb.17, 18B).

Tab. 8 Mittelwerte Ki67-positiver Zellen im ipsi- und contralateralen GD von Ischämietieren

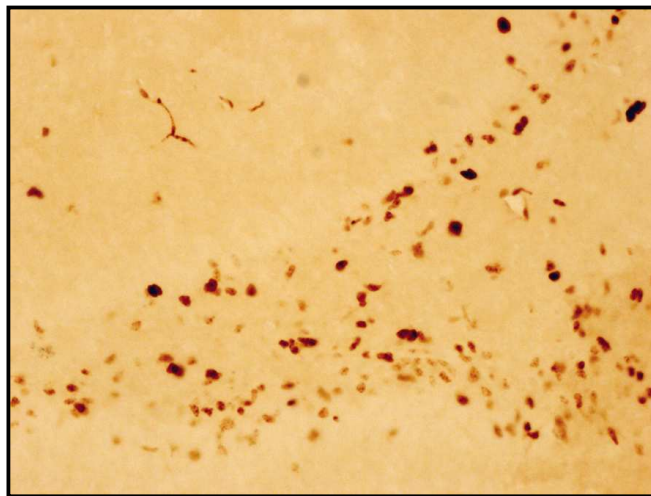
PIT (PNT)	Anzahl der Tiere	Ipsilateral		Contralateral	
		Mittelwert (Zellzahl)	Std.Abw.	Mittelwert (Zellzahl)	Std.Abw.
1(8)	4	16.3	3.4	12.2	2.6
2(9)	4	20.3	4.1	18.2	1.2
3(10)	4	7.0	2.8	5.8	2.9
7(14)	4	13.0	4.0	9.2	4.4
10(17)	4	7.3	1.1	6.1	2.1
14(21)	3	6.8	3.7	5.2	2.5
21(28)	3	6.2	1.8	6.3	0.8
28(35)	2	10.7	0.9	4.2	1.3
42(49)	2	1.8	1.0	0.7	1.0

Abb. 17 Proliferierende Zellen mit Ki67-Markierung (MV200x) - GD
PIT2

Ipsilateral



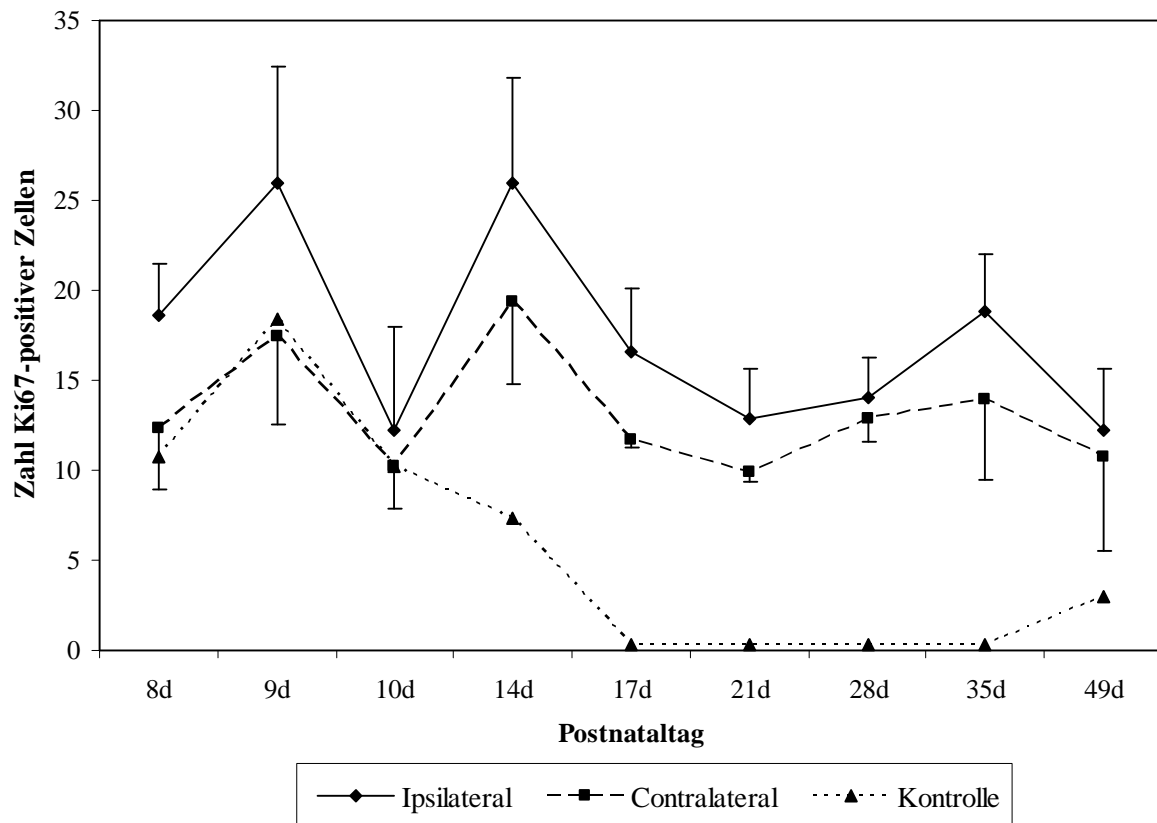
Contralateral



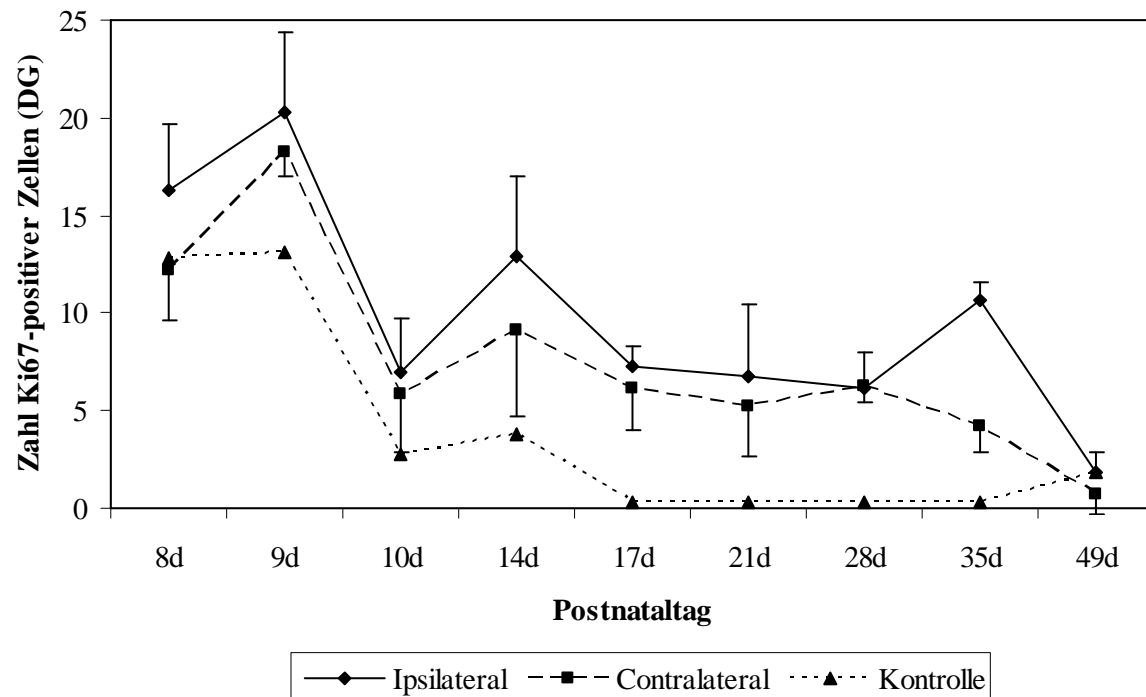
Darstellung proliferierender Zellen mittels immunohistochemischer Markierung des mitotischen Kernproteins Ki67 im GD (Bregma -3,3mm) von Ischämietieren. An PIT2 sind zahlreiche proliferierende Zellen (braunefarbte Zellkerne) sowohl ipsi- als auch contralateral zu verzeichnen.

Abb. 18 Graphische Darstellung der Quantifizierung Ki67-positiver Zellen

A Zona subventricularis



B Gyrus dentatus



Quantifizierung proliferierender (Ki67-positiver) Zellen in ZSV (A) und GD (B) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm) im Zeitraum zwischen PNT8-49 (PIT1-42), Angabe der Varianz als +/- Std.Abw.(pro mm²).

3.3.2. Neurogenese und Migration nach cerebraler Ischämie

Das Phosphoprotein Doublecortin (DCX) wird vorübergehend von proliferativen Vorläuferzellen und migrierenden Neuroblasten ausgebildet. Sowohl Hirnschnitte von Ischämietieren als auch von Kontrolltieren verschiedener Altersgruppen wurden mit dem Antikörper Anti-DCX zur Markierung von Neurogenese und Migration behandelt und gegeneinander verglichen.

Im Bereich der ZSV konnten im Alter von PNT8 (PIT1), außer vereinzelt in der ipsilateralen ZSV von Ischämietieren kaum markierte Zellen entdeckt werden (Abb. 19). An PIT3 wurden ipsi- sowie contralateral erste wenige DCX-positive Zellen sichtbar, wobei contralateral nur Zellkörper und ipsilateral auch filamentartige Zellfortsätze markiert waren. In dieser Altersgruppe glich das Bild der contralateralen ZSV dem der Kontrollen (Abb. 20).

An PIT7 fand man einen großen Zuwachs an Neuroblasten mit in Richtung der Läsion weisenden dendritischen Verlängerungen, während die Gegenseite keine wesentlichen Veränderungen erkennen lies (Abb. 21).

Am 10. PIT zeigten sich die markierten Zellen im ipsilateralen Bereich weniger dicht als drei Tage zuvor, jedoch waren ihre Prolongationen deutlich länger. Diese langen Zellfortsätze gelten als Zeichen der Migration der neu gebildeten Zellen. Im Sektor der contralateralen ZSV traten nun auch zahlreiche markierte Zellkörper in Erscheinung. In den Kontrolltieren sind weiterhin markierte Zellen, jedoch kein weiterer Zuwachs zu verzeichnen (Abb. 22).

Mit PIT14 verminderte sich die Menge an DCX-positiven Zellen auf der Läsionsseite. Auffallend waren ihre zunehmend weitere Entfernung von der ZSV sowie von ihnen hinterlassene filamentartige Spuren als Zeichen ihrer migratorischen Aktivität. Die contralaterale Seite sowie auch die Kontrolltiere schienen verglichen zum 10. PIT die Anzahl an Neuroblasten nahezu konstant zu halten. (Abb. 23).

Nach drei Wochen (PIT21) waren kaum noch DCX-positive Zellen im direkten Bereich der ZSV zu sehen. Jedoch entfernter und in deutlicher Nähe zum Infarktgebiet fand man nun teilweise in Gruppen versammelte Zellkörper mit Fortsätzen (Abb. 24). Auf der Gegenseite diminuierte sich die Zahl neu gebildeter Neuroblasten und ließ kaum noch eine Markierung erkennen. Bei den Kontrolltieren im entsprechenden Alter (PNT28) hingegen waren vereinzelte Zellen auffindbar, teilweise besaßen sie Fortsätzen (Abb. 24).

Während an PIT42 keine DCX-positiven Zellen sowohl bei der Kontrollgruppe als auch in der contralateralen ZSV von Ischämietieren mehr zu erkennen waren, fiel die Läsionsseite durch eine ZSV-ferne spurenartige Markierung von Zellfortsätzen und ablassenden

Zellkörpern auf (Abb. 25).

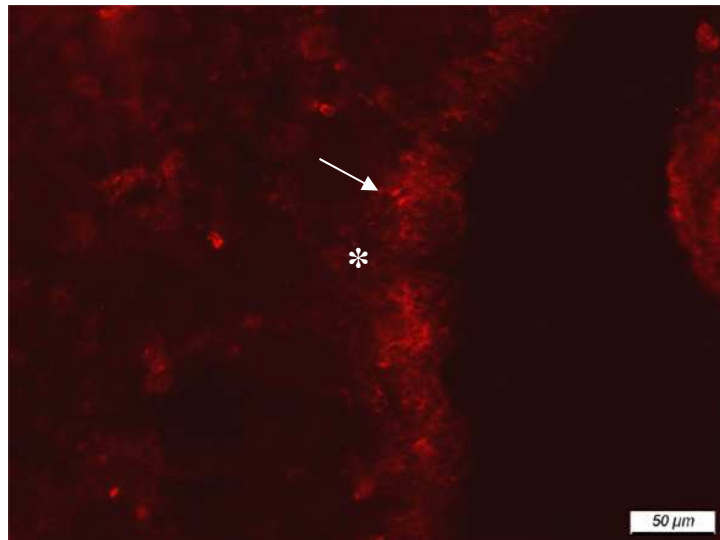
Zusammenfassend betrachtet, fand in der ZSV der Läsionsseite eine ischämieinduzierte Neurogenese mit anschließender Migration der neu gebildeten Neuroblasten in Richtung des geschädigten Gewebes statt. Diese Neurogenese trat erstmals an PIT3 auf und erreichte ihr Maximum bereits am 7. PIT. Auffallend war die Ausbildung von Prolongationen zu allen Zeitpunkten, die jedoch am besten zwischen PIT7 und PIT10 charakterisiert werden konnten. Nach PIT10 wurden deutlich sich von der ZSV entfernende DCX-positive Zellen identifiziert, die offensichtlich in Läsionsrichtung zu migrieren begonnen hatten. Dieses Phänomen konnte in geringerem Maße selbst nach 6 Wochen (PIT42) noch beobachtet werden. Im direkten Grenzgebiet zur Kavität wurden insbesondere an PIT21 und PIT28 Zellen mit weit entwickelten Prolongationen entdeckt, die teils Fortsätze von enormer Länge besaßen oder bi- bzw. multipolar waren (Abb. 26C-G).

Auf der Seite contralateral zur Läsion wurde ebenfalls eine Neubildung von Neuroblasten entdeckt, welche jedoch im Vergleich zur ipsilateralen Hemisphäre wesentlich später einsetzte. So konnte ihr Beginn zwischen dem 7. und 10. PIT ausgemacht werden. Nach einem Maximum zwischen dem 10. und 14. PIT fiel sie kontinuierlich ab und 6 Wochen nach Ischämieinduktion (PIT42) waren keine markierten Zellen mehr auffindbar. Im Gegensatz zur Läsionsseite zeigten die contralateralen neu gebildeten Neuroblasten kaum filamentartige Verlängerungen. Einzig zum Zeitpunkt PIT14 konnten einzelne etwas weiter von der ZSV entfernte Zellen mit kurzen Prolongationen entdeckt werden. Eine kurzzeitige migratorische Aktivität trat also auch hier auf (Abb. 26B).

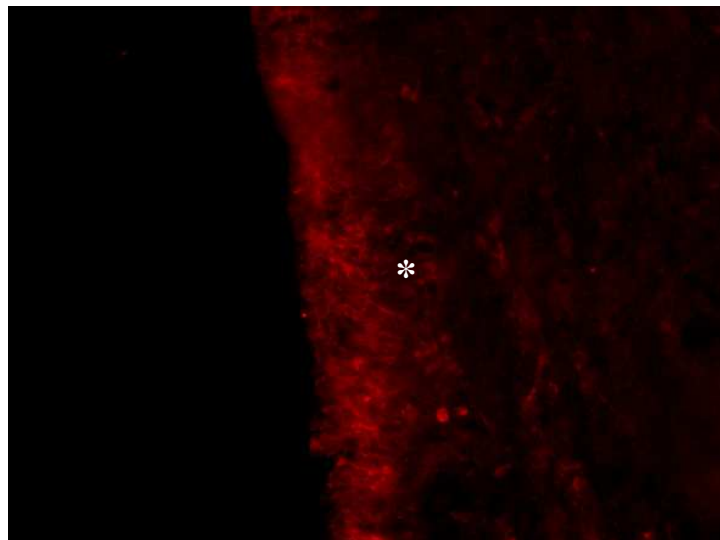
Neurogenetische Vorgänge wurden auch in der ZSV von Kontrolltieren beobachtet. Im Alter von PNT17 (entspricht PIT10) fand man erste DCX-positive Zellkörper, deren Anzahl sich im Zeitraum PNT21 bis PNT28 (entspricht PIT14 bis PIT21) erhöhte und schließlich auf ein scheinbares Basisniveau von nur vereinzelt, markierten Zellen zu PNT49 (entspricht PIT42) abfiel. Zelluläre Prolongationen und Migration konnten bei den untersuchten Kontrollen nicht eindeutig festgestellt werden.

PIT1

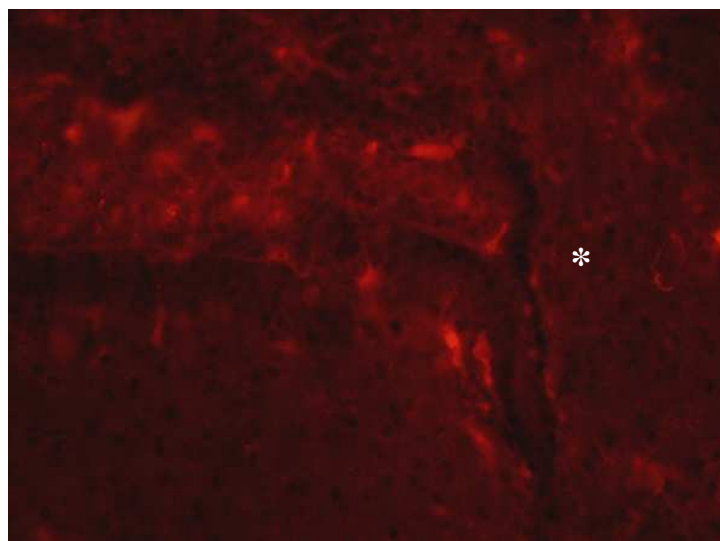
Ipsilateral



Contralateral



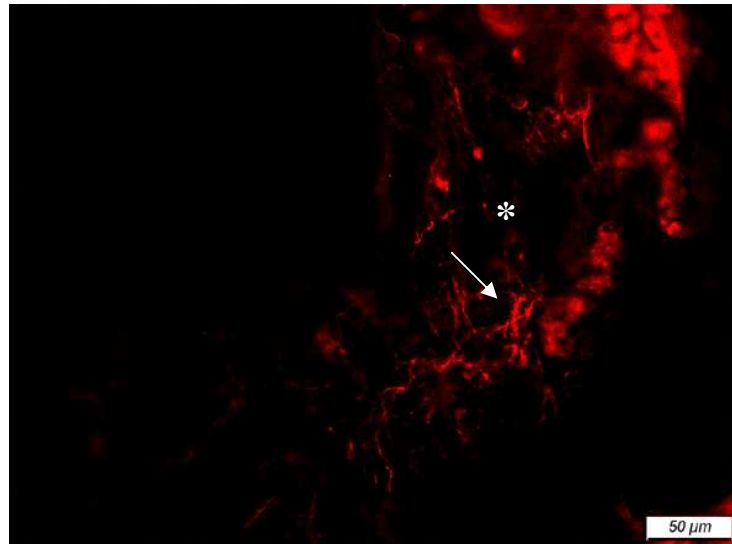
Kontrolle



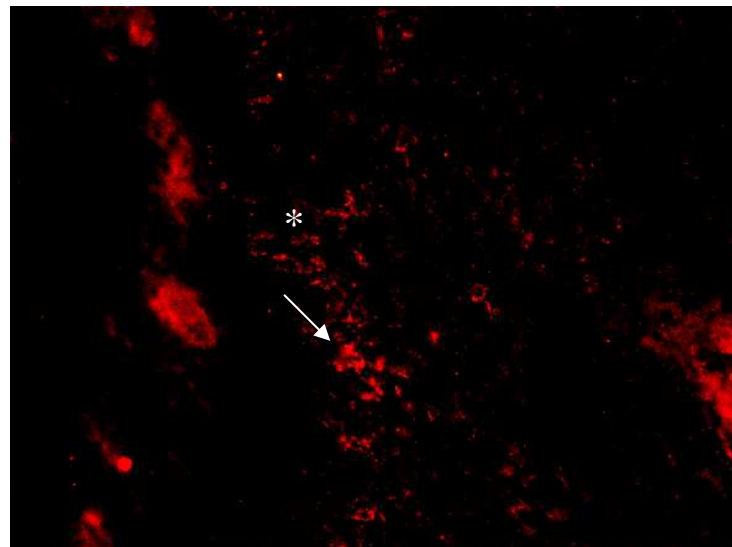
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung in der ZSV (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT1 sind kaum markierte Zellen vorfindbar, außer vereinzelt in der ipsilateralen ZSV von Ischämietieren (Pfeil).

PIT3

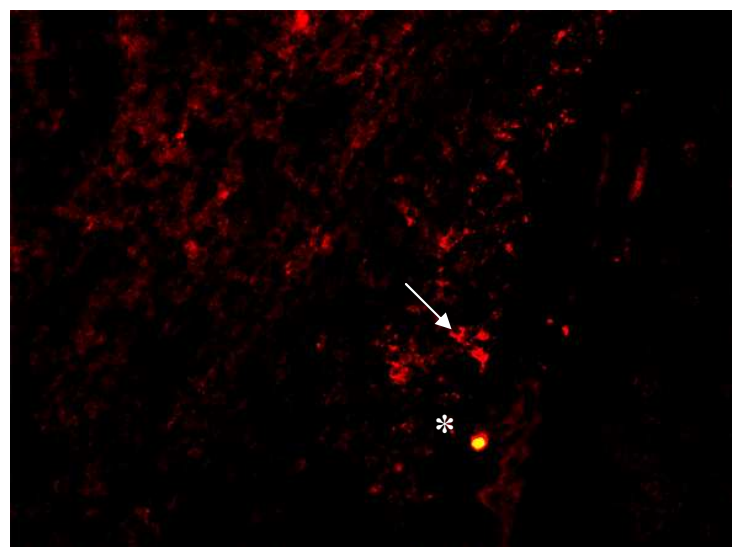
Ipsilateral



Contralateral



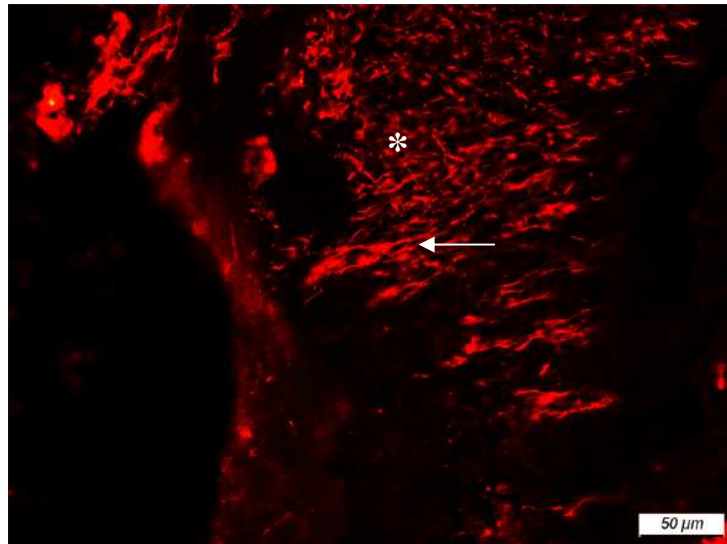
Kontrolle



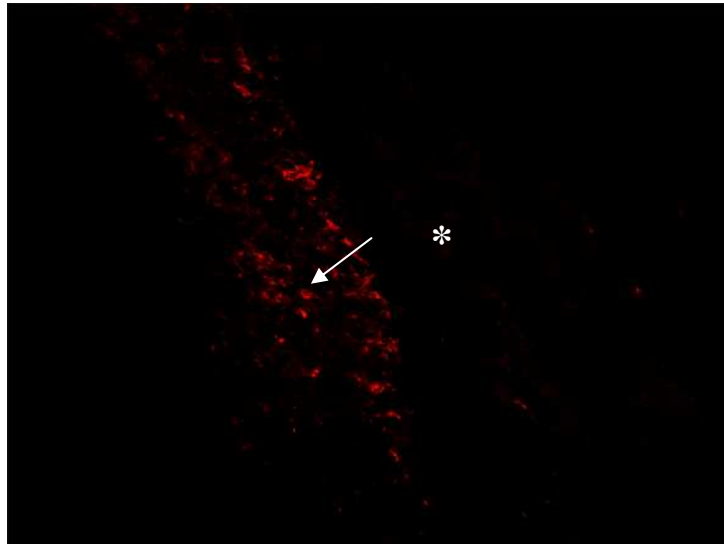
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung in der ZSV (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT3 wurden erste markierte Zellkörper (Pfeil) erkennbar in allen untersuchten Gruppen. In der ipsilateralen ZSV von Ischämietieren sind auch filamentartige Zellfortsätze markiert.

PIT7

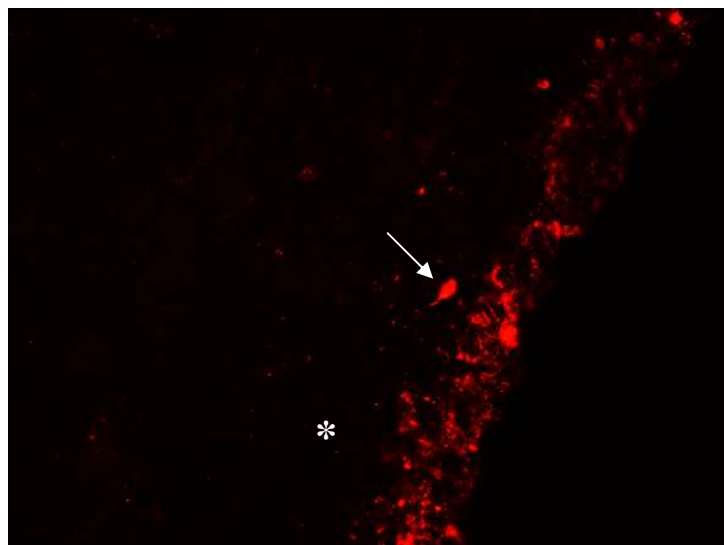
Ipsilateral



Contralateral



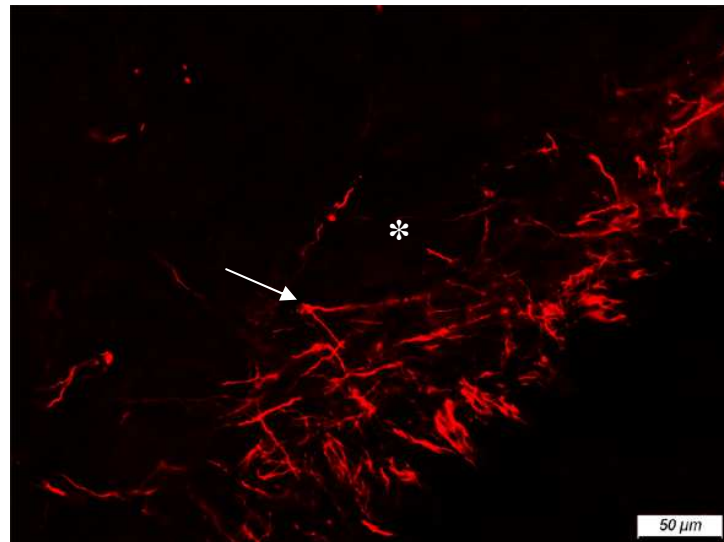
Kontrolle



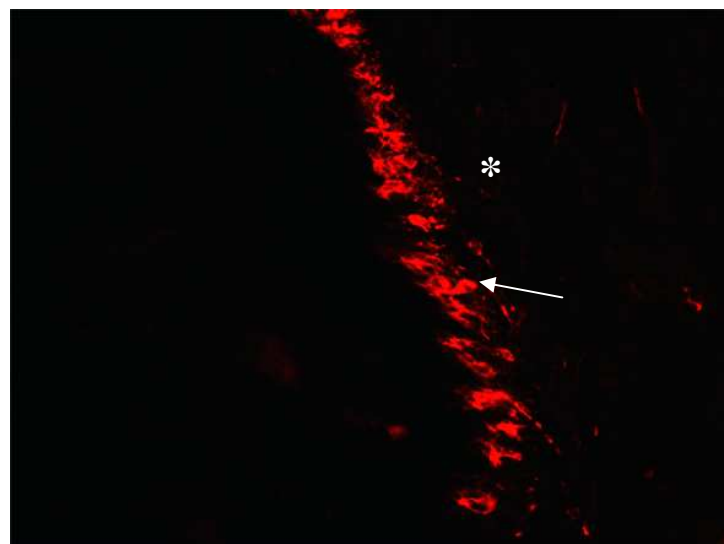
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung in der ZSV (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT7 sind ipsilateral zahlreiche DCX-positive Zellen mit denditischen, in Läsionsrichtung weisenden Prolongationen (Pfeil) erkennbar. In der contralateralen sowie in der ZSV von Kontrolltieren sind einzelne Zellkörper markiert (Pfeil).

PIT10

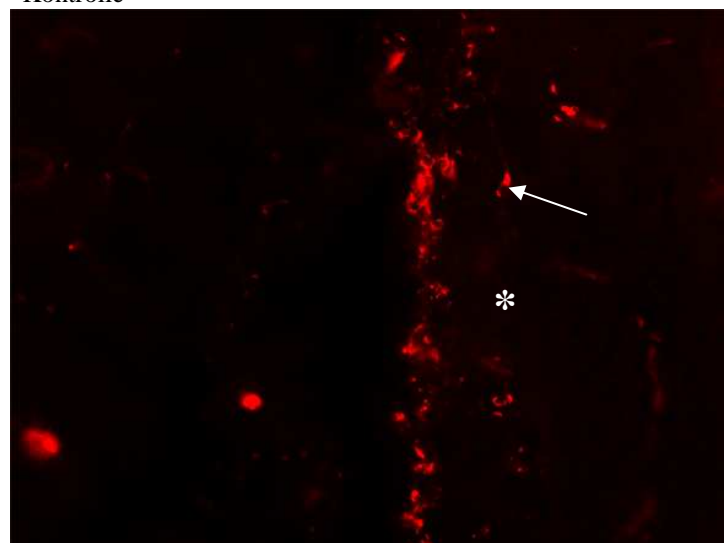
Ipsilateral



Contralateral



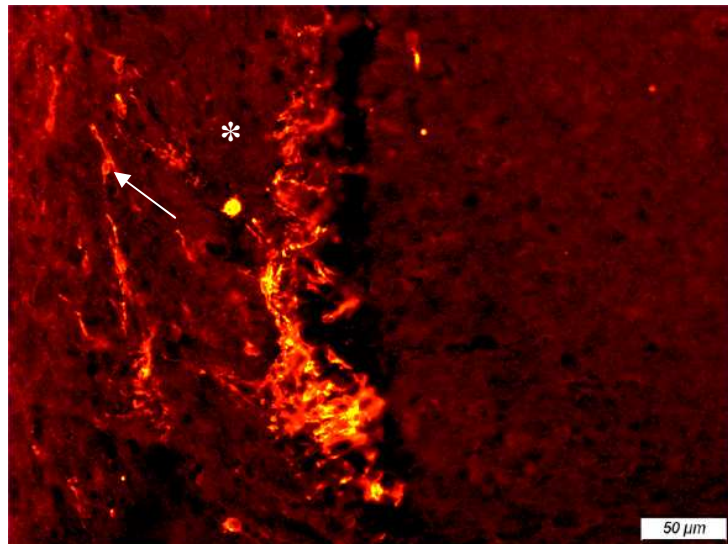
Kontrolle



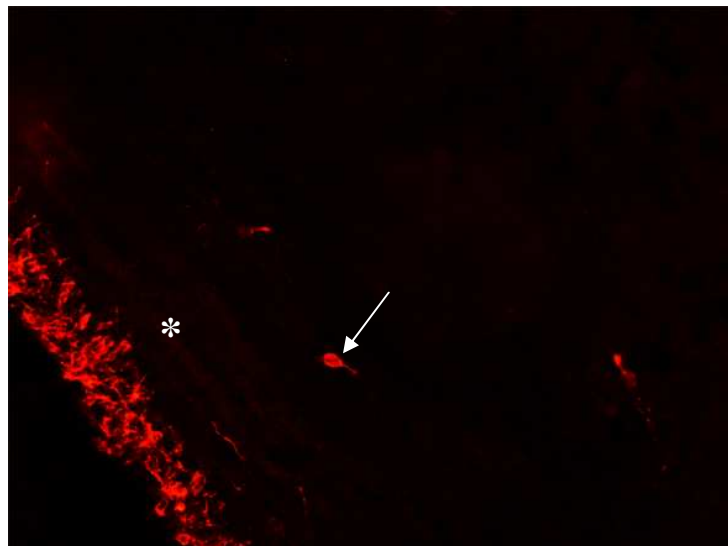
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung in der ZSV (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT10 zeigen sich markierte Zellen ipsilateral weniger dicht als zu PIT7, jedoch sind ihre Prolongationen nun deutlich länger (Pfeil). In der contralateralen ZSV werden zunehmend DCX-positive Zellkörper erkennbar. Bei den Kontrolltieren sind weiterhin einzelne Zellkörper markiert (Pfeil), ein Neurogenesezuwachs ist nicht zu verzeichnen.

PIT14

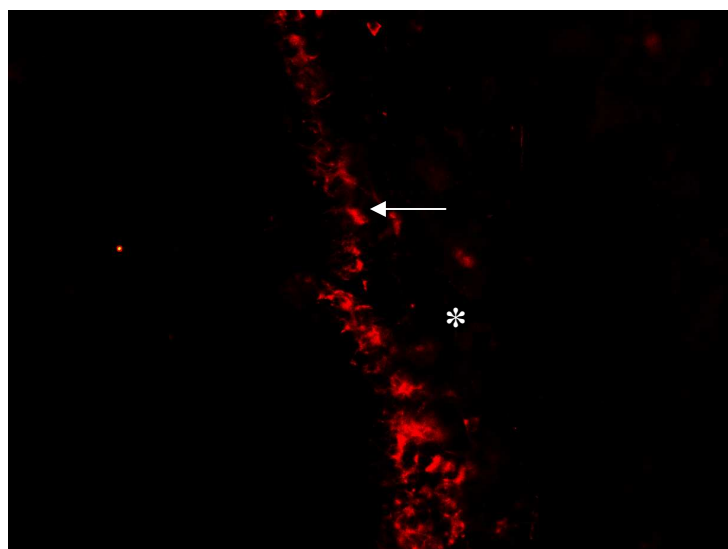
Ipsilateral



Contralateral



Kontrolle

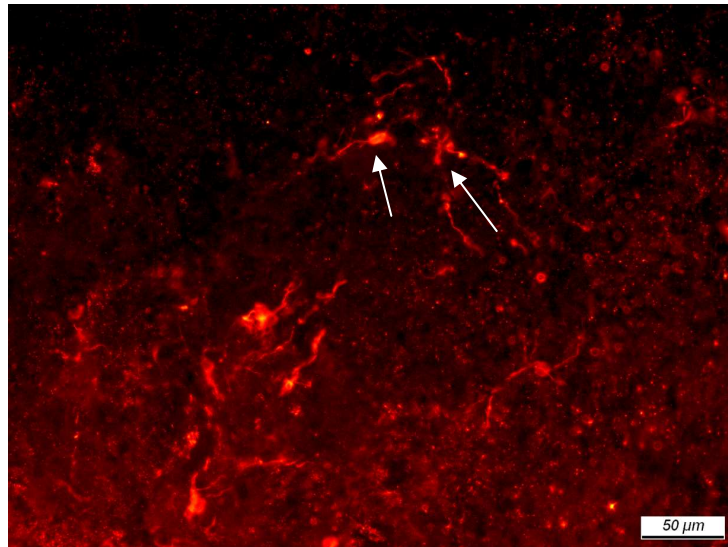


Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung in der ZSV (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT14 ist ipsilateral nur noch eine verminderte Anzahl markierter, sich zunehmend von der ZSV entfernender Zellen zu finden (Pfeil). Auf contralateraler Seite sowie bei den Kontrolltieren waren nahezu gleich bleibende Markierungen zur PIT10-Gruppe erkennbar.

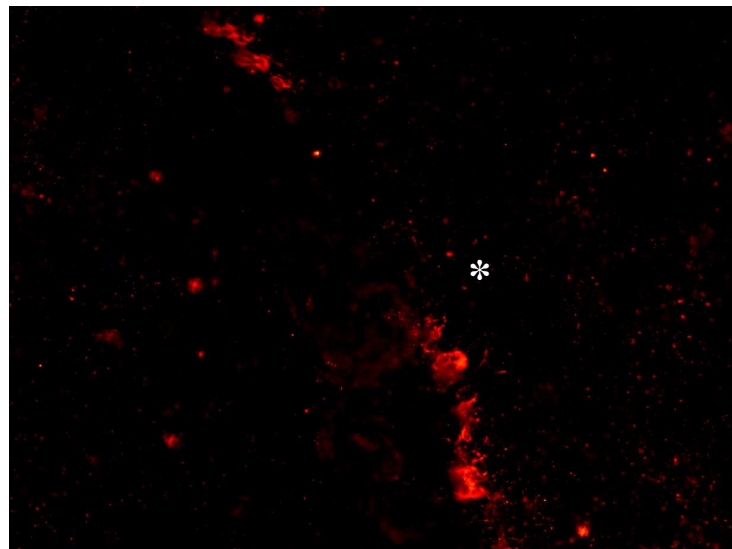
Abb. 24 Neurogenese und Migration DCX-markierter Zellen (MV200x)
 - ZSV und angrenzende Cortexregion

PIT21

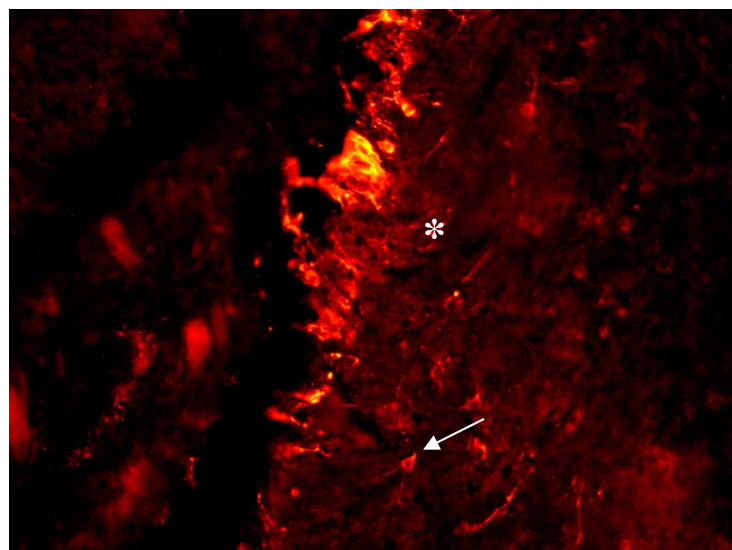
Ipsilateral



Contralateral



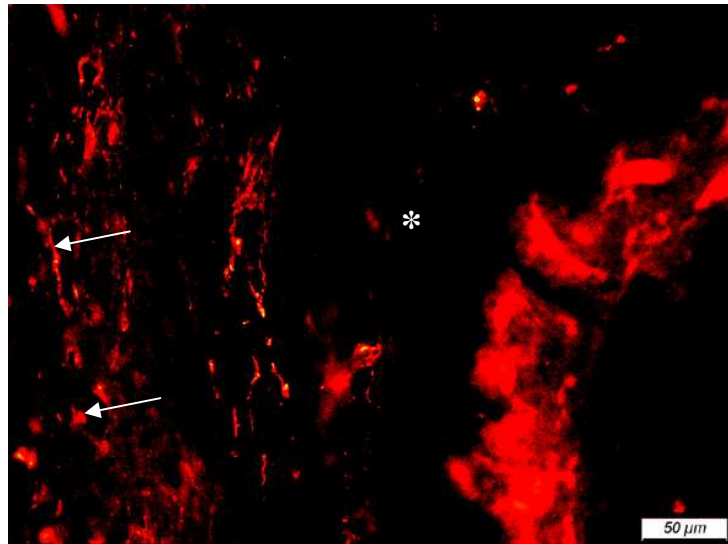
Kontrolle



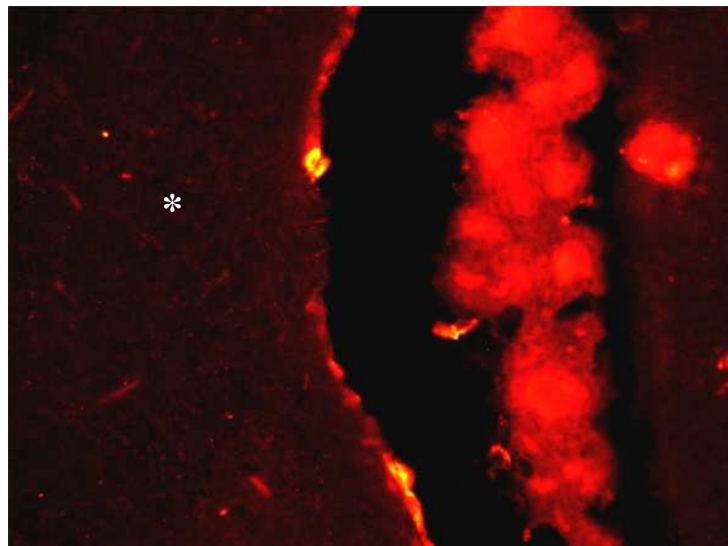
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung bei Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT21 ist im direkten Bereich der ipsilateralen ZSV kaum noch eine Markierung zu finden, jedoch siedeln nun in infarktnahen Cortexbereichen Gruppen DCX-positiver Zellen mit Fortsätzen (Pfeil). In der contralateralen ZSV (Stern) ist kaum noch eine Markierung erkennbar. Die ZSV von Kontrolltieren zeigt vereinzelte, markierte und teilweise mit Fortsätzen bestückte Zellen

PIT42

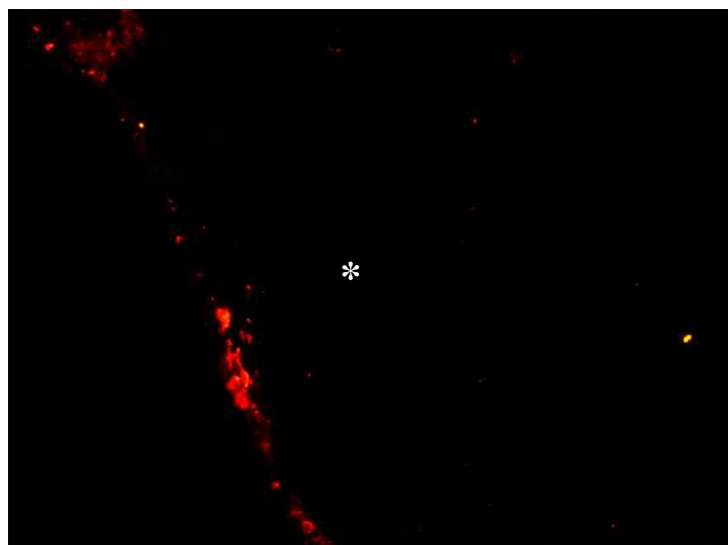
Ipsilateral



Contralateral



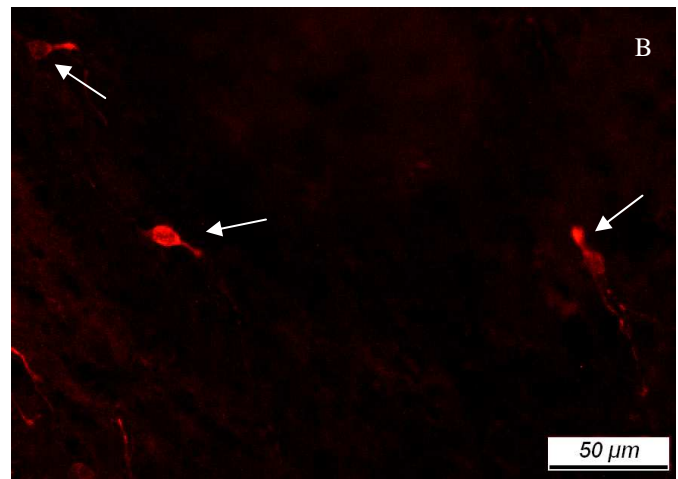
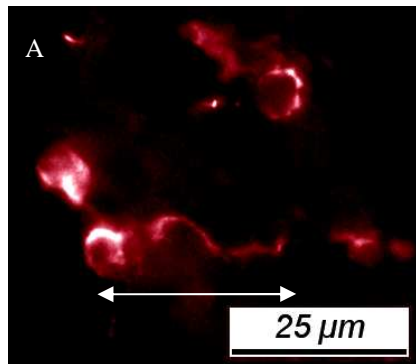
Kontrolle



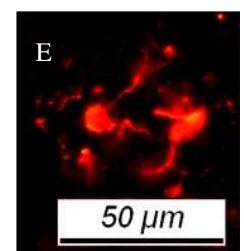
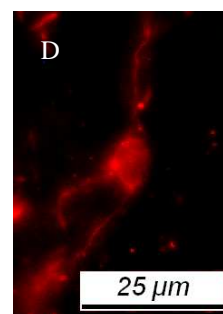
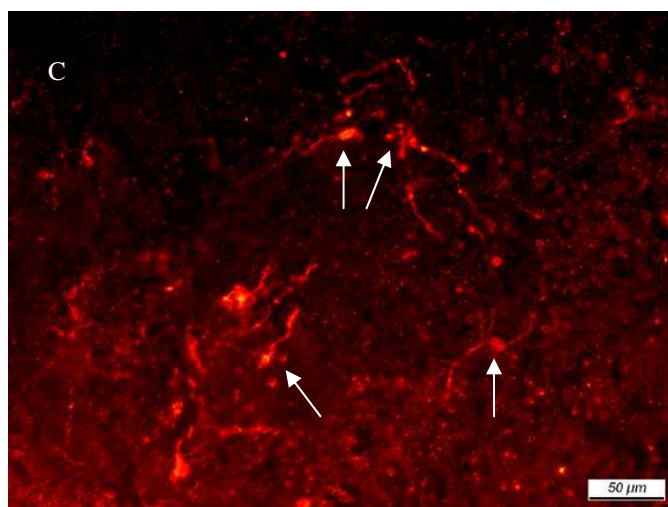
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung bei Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3m). An PIT42 konnte keine eindeutige DCX-positive Zellmarkierung gefunden werden. Allerdings fiel die ipsilaterale ZSV (Stern) von Ischämietieren auf durch spurenartige Markierung von Zellfortsätzen und vereinzelten, verblässenden Zellkörpern (Pfeile). Contralateral sowie in der ZSV (Stern) von Kontrolltieren war keine Markierung mehr erkennbar.

Abb. 26 Migrierende DCX-markierter Zellen und ihre Morphologie

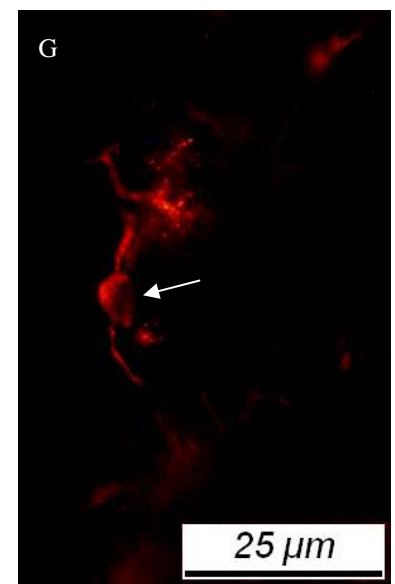
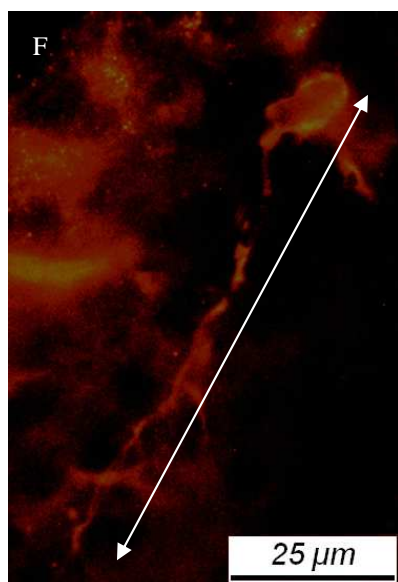
PIT14



PIT21



PIT28



Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung im ZSV-fernen Läsionsgebiet von Ischämietieren (Bregma -3,3mm). Erstmals können DCX-positive Zellen mit Zellfortsätzen im Grenzgebiet zur Läsion an PIT14 beschrieben werden (A, Doppelpfeil). Auch auf der contralateralen Seite findet man zu diesem Zeitpunkt sich von der ZSV entfernende, in Richtung Cortex wandernde Neuroblasten (B, Pfeil). An PIT21 sind nestartige Zellgruppierungen im Läsionsgebiet verteilt (C, Pfeile, E). Die markierten Neuroblasten sind zum Teil multipolar, d.h. sie besitzen zahlreiche Prolongationen (D). An PIT28 können an der Grenze zur Kavität Neuroblasten mit enormen Fortsatzlängen (F, Doppelpfeil) sowie einer Bi-/Multipolarität (G, Pfeil) dargestellt werden.

Der Beginn neurogenetischer Aktivität im GD der Insult- wie auch der Gegenseite wurde am 7. PIT (PNT14) beobachtet. Ihr Verteilungsmuster in der subgranulären Zone des ipsilateralen GD war zu diesem Zeitpunkt diffus. Doch auch die Kontrolltiere im entsprechenden Alter zeigten eine zarte Hervorhebung zellulärer Strukturen (Abb. 27).

Deutliche DCX-positive Zellkörper konnten ipsi- wie auch contralateral erst an PIT10 (PNT17) ermittelt werden. Sie begannen sich bereits in den untersten Schichten des GD einzuordnen und auszurichten. Die untersuchten Kontrollen (PNT17) waren scheinbar auf dem Entwicklungsniveau PNT14 stehen geblieben (Abb. 28).

Am 14. PIT wurde beidseits erstmalig die Ausprägung von Prolongationen sichtbar, die sich bereits alle vom GD fortweisend nach außen orientierten. Interessanterweise war auch zu diesem Zeitpunkt bei den Kontrolltieren weniger Zellkörpermarkierung erkenntlich als bei den Ischämietieren, jedoch waren zahlreiche hauchzarte axonartige Verlängerungen vorhanden (Abb. 29).

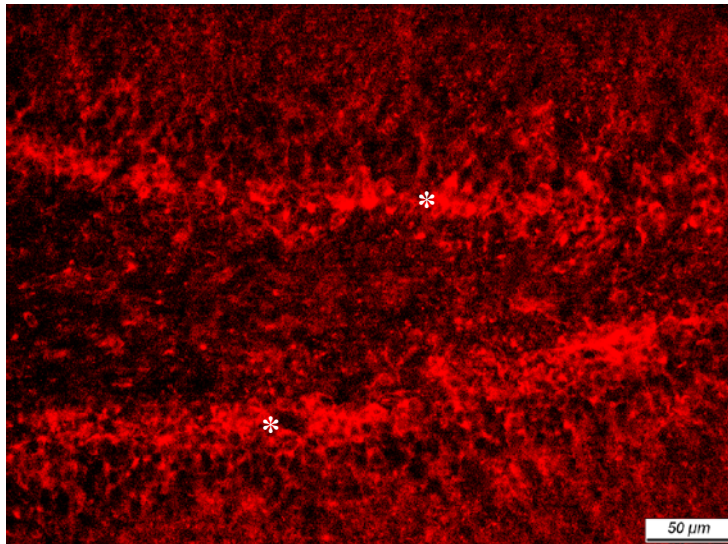
Ein Maximum an Neurogeneseaktivität konnte an PIT21 ermittelt werden, wobei keine Unterschiede zwischen ipsilateraler und contralateraler sowie Kontrollhemisphären zu verzeichnen waren. Generell hoben sich deutlich markierte Zellkörper hervor. Hiervon besaß der in den äußeren Regionen des GD (Granularzellschicht) sitzende Teil markierter Zellen bereits lange ausgeprägte Fortsätze. Die weiter medial (Subgranularzellschicht) residierenden Zellen zeigten lediglich DCX-positive Zellkörper (Abb. 30).

An PIT42 wurde bei allen untersuchten Tieren eine Neurogeneseverminderung vorgefunden. Auf der Insultseite waren jedoch mehr neu gebildete Neuroblasten mit Prolongationen markiert als auf der Gegenseite. Bei den Kontrollen sah man nur noch stark vereinzelte hervorgehobene Zellen (Abb. 31).

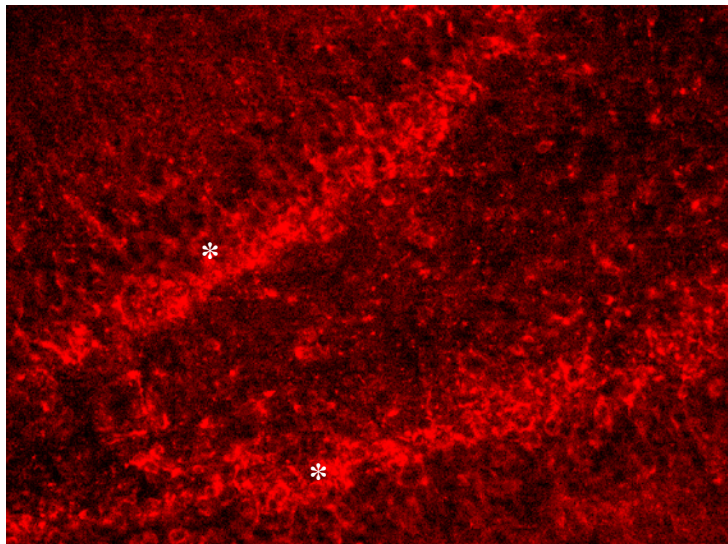
Im Gegensatz zur ZSV konnte im GD mittels der verwendeten Untersuchungsmethoden eine Migration der neu gebildeten Neuroblasten nicht sicher differenziert werden.

PIT7

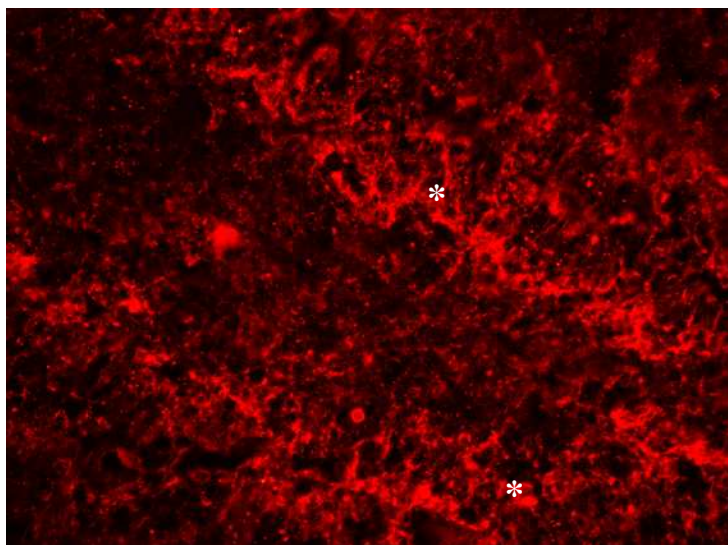
Ipsilateral



Contralateral

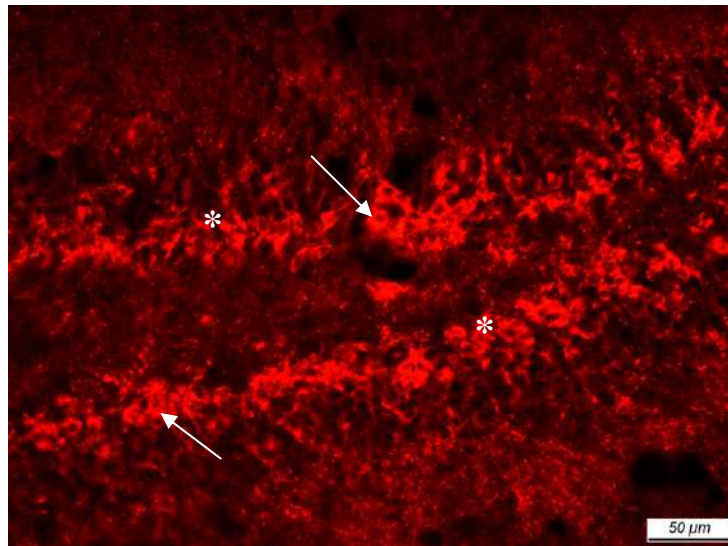


Kontrolle

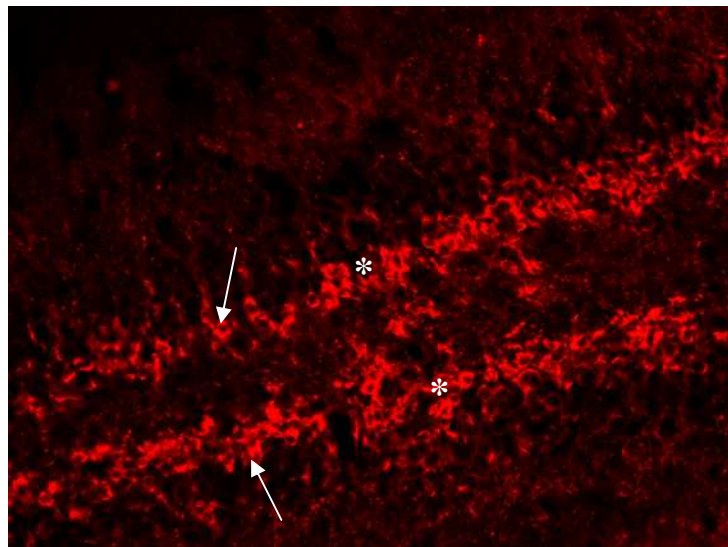


Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung im GD (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT7 (PNT14) wird im DG von Ischämietieren ipsi- wie auch contralateral erstmalig eine diffuse DCX-Markierung sichtbar. Auch die Kontrollen lassen zart hervorgehobene Strukturen erkennen.

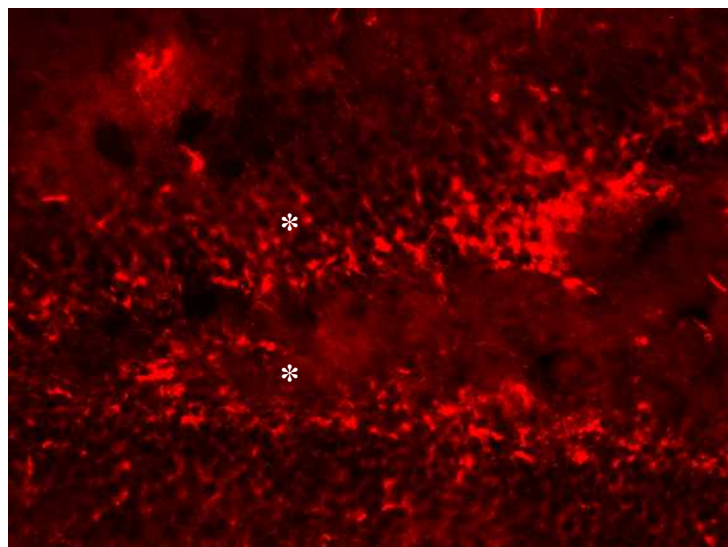
PIT10 Ipsilateral



Contralateral



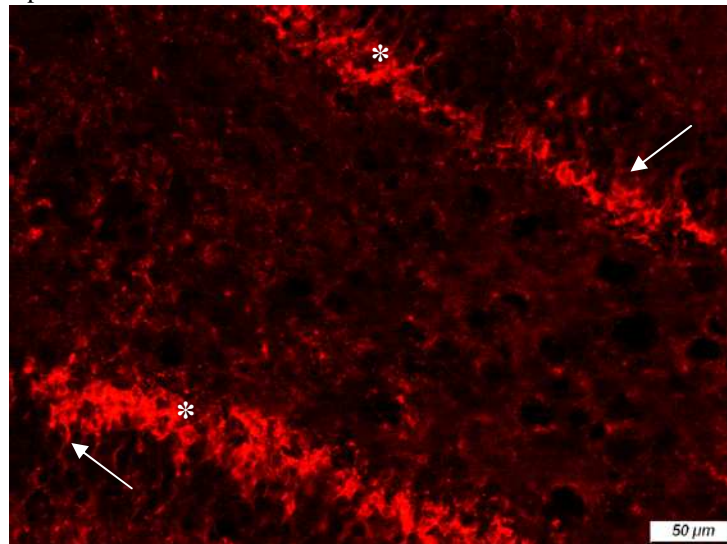
Kontrolle



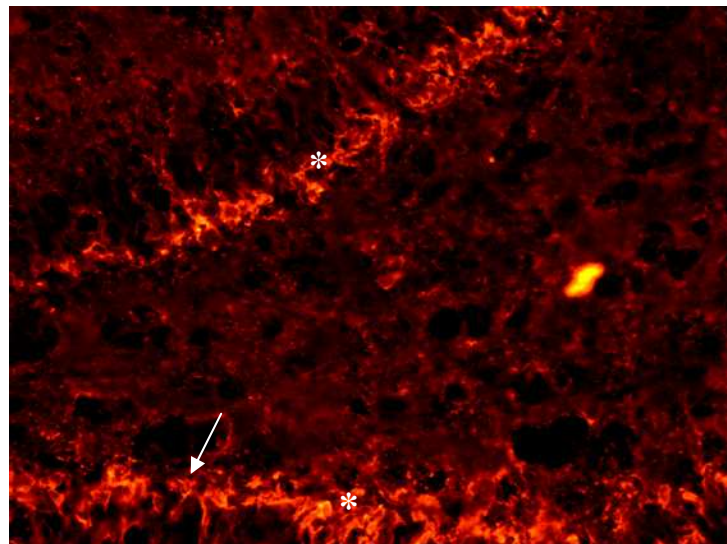
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung im GD (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT10 (PNT17) werden sowohl im ipsi- als auch contralateralen DG von Ischämietieren markierte Zellkörper (Pfeil) erkennbar. Sie beginnen sich bereits teilweise linienförmig auszurichten. Im Gegensatz dazu zeigen die Kontrollen kaum noch hervorgehobene Strukturen.

PIT14

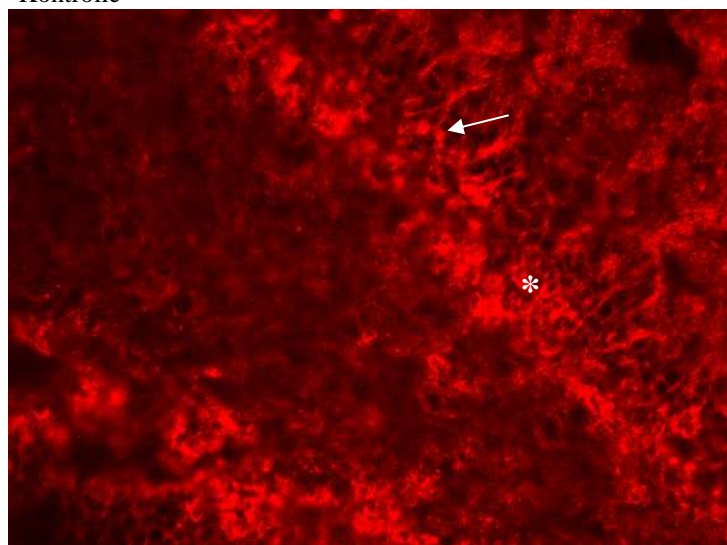
Ipsilateral



Contralateral



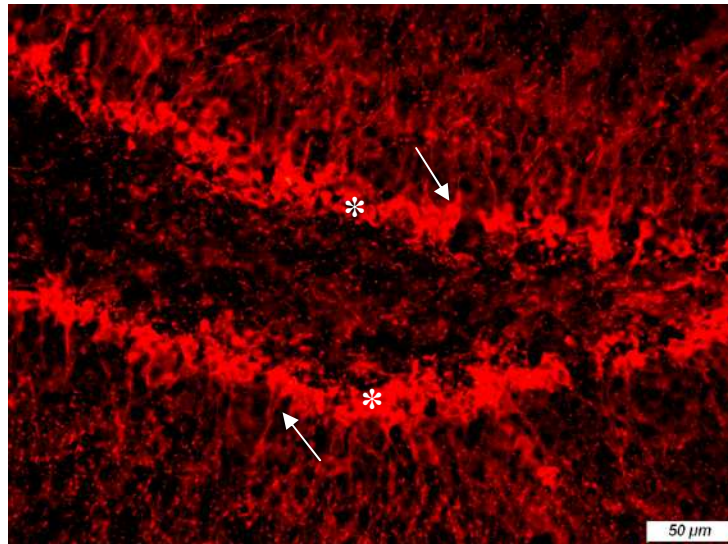
Kontrolle



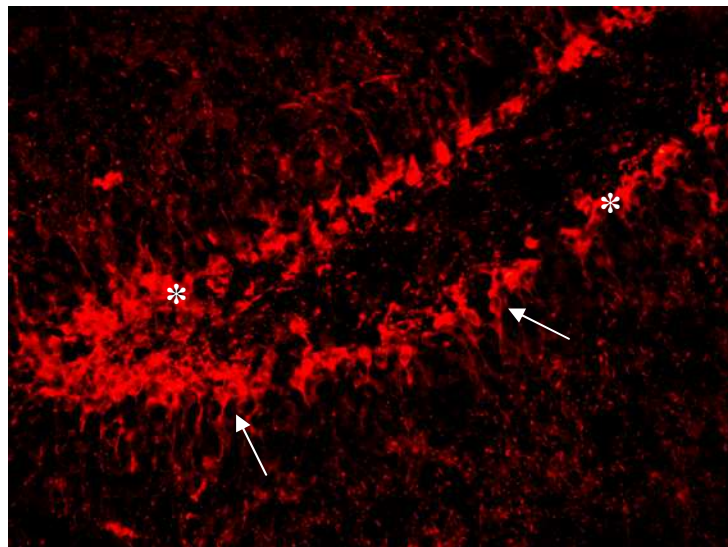
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung im GD (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT14 (PNT21) werden sowohl im ipsi- als auch contralateralen DG von Ischämietieren erstmalig markierte Zellkörper mit Prolongationen (Pfeil) erkennbar, welche nach außen vom GD fortweisend orientiert sind. Bei den Kontrollen sind ebenfalls DCX-positive Zellkörper mit feinen Prolongationen (Pfeil) erkennbar.

PIT21

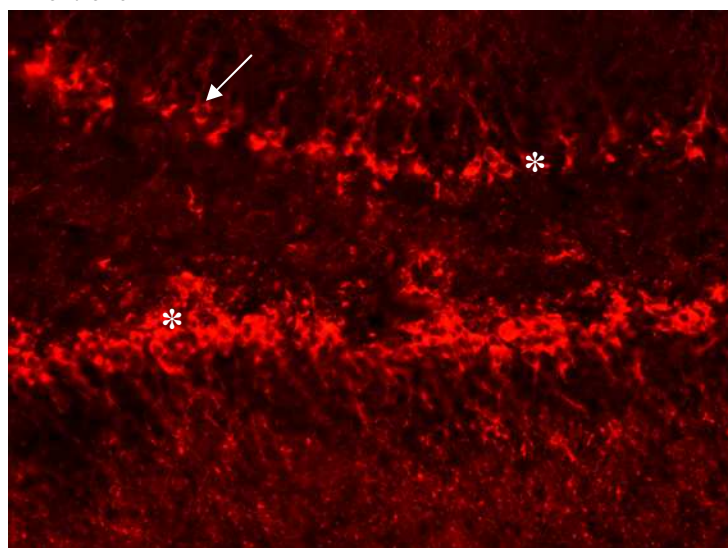
Ipsilateral



Contralateral



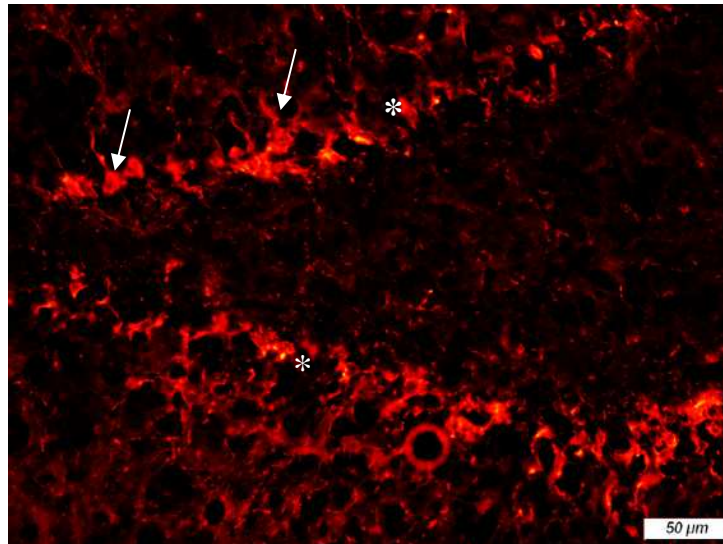
Kontrolle



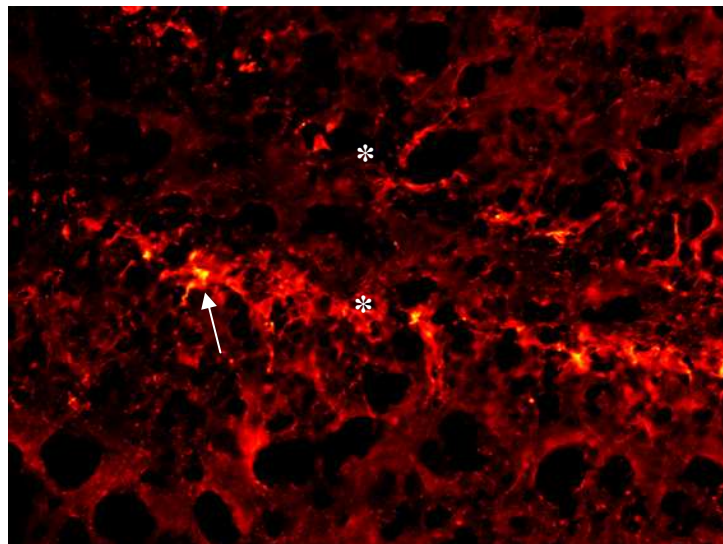
Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung im GD (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT21 (PNT28) konnte ein Maximum an Neurogeneseaktivität festgestellt werden. Sowohl im ipsi- und contralateralen DG von Ischämietieren als auch im DG von Kontrolltieren sind markierte Zellkörper mit Prolongationen (Pfeil) zu verzeichnen.

Abb. 31 Neurogenese DCX-markierter Zellen (MV200x) - GD
PIT42

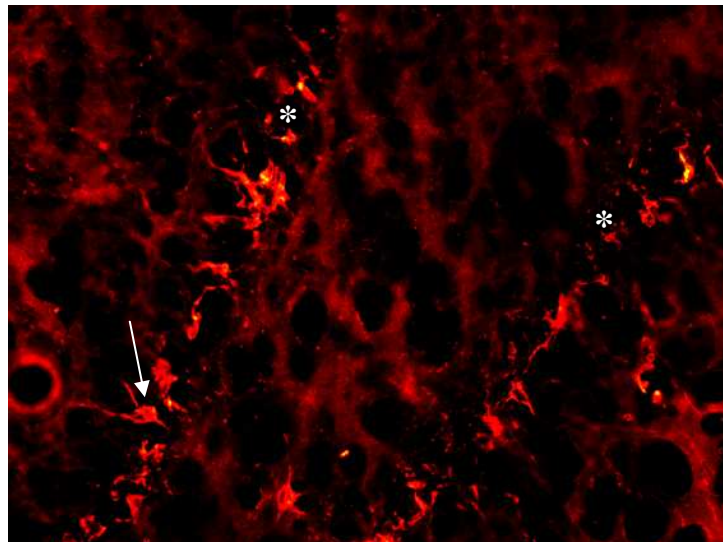
Ipsilateral



Contralateral



Kontrolle



Darstellung einer DCX-Immunofluoreszenz-Markierung im GD (Stern) von Ischämie- und Kontrolltieren (Bregma -3,3mm). An PIT42 (PNT49) ist bei allen untersuchten Tieren eine verminderte Neurogeneseaktivität erkennbar. Im ipsilateralen DG sind jedoch mehr DCX-positive Zellen mit Prolongationen (Pfeil) erkennbar als im contralateralen DG von Ischämietieren. Bei den Kontrollen sind nur noch vereinzelt markierte Zellkörper mit Prolongationen (Pfeil) zu verzeichnen.

3.4. Charakter der Proliferation und Neurogenese

Doppelmarkierungen wurden mit dem Ziel der besseren Analyse von Proliferation und Neurogenese durchgeführt. Die Doppelmarkierung mit Ki67 diene vor allem der genaueren Bestimmung der Zelltypen proliferierender Zellen, während bei der Doppelmarkierung mit DCX der Reifegrad sowie das Überleben bzw. mögliche Absterben neu gebildeter Neurone im Vordergrund standen.

5.4.1. Proliferation von neuroepithelialen Stammzellen

Eine Doppelmarkierung mit Ki67 und Nestin kann Hinweise geben auf einen frühen Entwicklungsstand proliferierender Zellen. Von Interesse war die Betrachtung der Zeitpunkte entsprechend der ermittelten Proliferationsmaxima.

Im Bereich der Läsion und der angrenzenden ZSV wurden an PIT2 zahlreiche Zellen angetroffen, deren Kerne Ki67-positiv und deren Zytoplasma sowie dendritische Fortsätze Nestin-positiv hervorgehoben waren (Abb. 32). Am 7. PIT fand man in derselben Region sowohl Ki67- als auch lange Nestin-positive Filamente, jedoch konnten keine Zellen entdeckt werden mit der gleichzeitigen Ausprägung beider Proteine. In der contralateralen ZSV wurden zu keinem Zeitpunkt doppelt markierte Zellen identifiziert.

Die Untersuchung des GD auf Zellen mit Doppelmarkierung ergab ein positives Ergebnis an PIT2 für die ipsilaterale Seite. So waren mehrere Zellkerne Ki67-markiert und gleichzeitig besaßen sie Nestin exprimierende Prolongationen (Abb. 32).

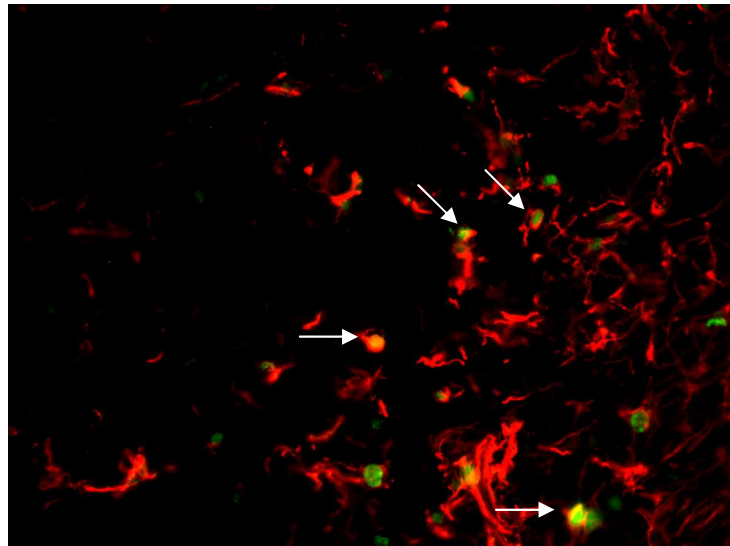
Auf der Gegenseite fand man generell weniger Ki67- und Nestin-Markierung, mehrfach gekennzeichnete Zellen waren nicht ersichtlich.

An PIT7 wurden sowohl Ki67-positive Zellkerne als auch Nestinfilamente identifiziert, eine Doppelmarkierung war nicht zu erkennen.

Abb. 32 Proliferation neuroepithelialer Stammzellen - Doppelmarkierung Ki67/Nestin (MV200x)

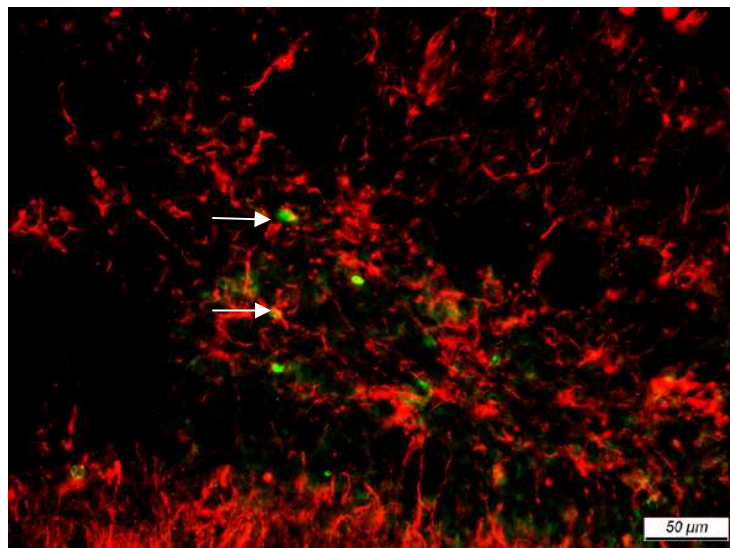
PIT2

Läsion und Zona subventricularis



PIT2

Gyrus dentatus (ipsilateral)



Darstellung einer Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung bei Ischämietieren (Bregma -3,3mm) mittels Ki67 (grün) und Nestin (rot). Doppelt markierte Zellen (Pfeil) sind an PIT2 im Läsionsgebiet und angrenzender ZSV sowie im ipsilateralen (lesionsseitigen) GD anzutreffen.

3.4.2. Proliferation von Astrozyten

Die Doppelmarkierung mit Ki67 und GFAP hatte die Aufdeckung des astrozytären Anteils proliferierender Zellen zum Ziel. Von Interesse war die Betrachtung der Zeitpunkte entsprechend der ermittelten Proliferationsmaxima an PIT2, 7 und 28.

Zum Zeitpunkt PIT2 wurden im Bereich der Läsion zahlreiche GFAP-positive und Ki67-positive Zellen entdeckt, davon war der Großteil doppelt markiert. Auch 7 Tage nach Ischämie fand man einzelne Zellen mit grün fluoreszierenden Zellkernen (Ki67) und rot hervorgehobenen Filamenten (GFAP) (Abb. 33). Im contralateralen Bereich war keine Doppelmarkierung erkennbar.

Im Bereich des GD konnten an PIT2 sowohl ipsilateral als auch contralateral doppelt markierte Zellen ausfindig gemacht werden. Auf der Seite der Läsion handelte es sich um Zellen mit großen hypertrophen Zellkörpern, während jene auf der Gegenseite klein und unauffällig waren (Abb. 34).

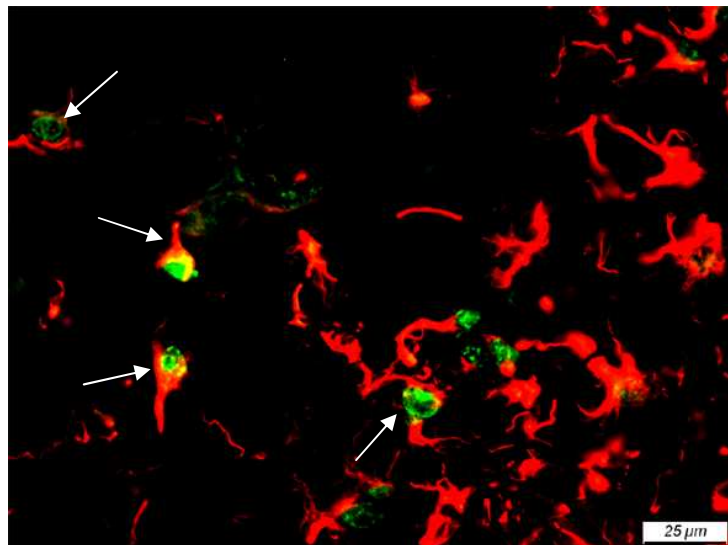
Am 7. postischämischen Tag waren weder im ipsi- noch im contralateralen GD gleichzeitig beide Proteine exprimierende Zellen ersichtlich.

Nach vier Wochen (PIT28) waren weder im Bereich der Läsion und der ZSV noch im GD doppelt markierte Zellen anzutreffen.

Abb. 33 Proliferation von Astrozyten – Doppelmarkierung Ki67/GFAP (MV400x)

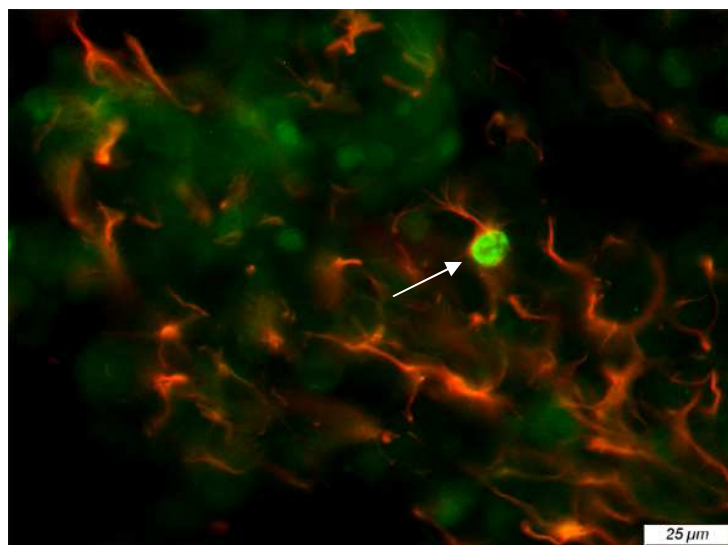
PIT2

Läsion und Zona subventricularis



PIT7

Läsion und Zona subventricularis

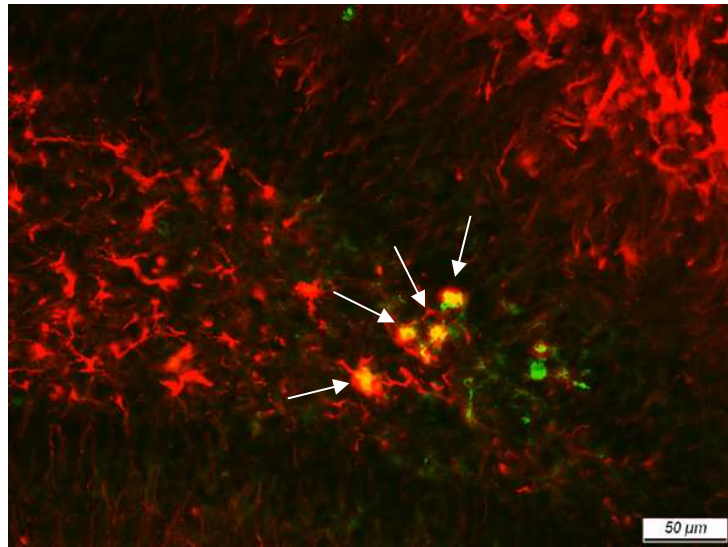


Darstellung einer Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung bei Ischämietieren (Bregma -3,3mm) mittels Ki67 (grün) und GFAP (rot). Doppelt markierte Zellen (Pfeil) sind im Läsionsgebiet und angrenzender ZSV an PIT2 und in verminderter Anzahl auch an PIT7 sichtbar.

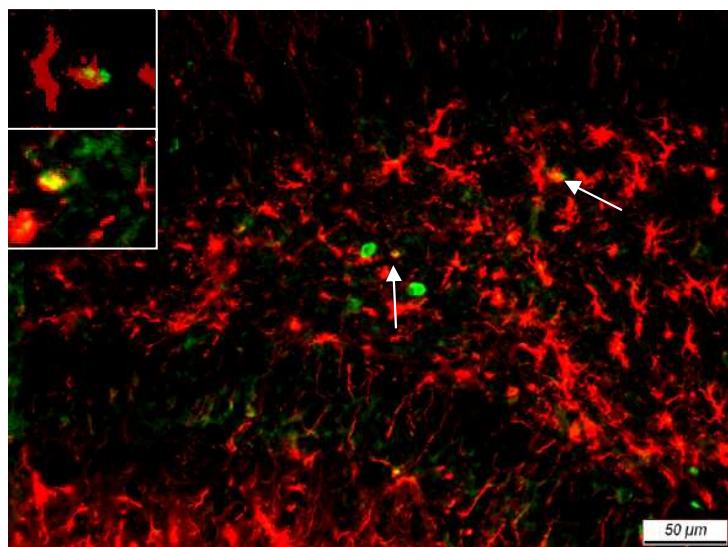
Abb. 34 Proliferation von Astrozyten - Doppelmarkierung Ki67/GFAP im GD (MV200x)

PIT2

Ipsilateral



Contralateral



Darstellung einer Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung im GD von Ischämietieren (Bregma -3,3mm) mittels Ki67 (grün) und GFAP (rot). Doppelt markierte Zellen (Pfeil) werden im GD an PIT2 ipsilateral in Form von reaktiv-hypertrophen Zellkörpern und contralateral mit verminderter Reaktivität (kleine, unscheinbare Zellkörper, siehe auch Kästen im Bild) sichtbar.

3.4.3. Ausprägung neuronaler Progenitoren

Zahlreiche DCX-positive Zellen wurden im Bereich der ZSV und auch der Läsion detektiert. Während DCX von neu gebildeten Zellen über einen längeren Zeitraum exprimiert wird, findet man Nestin nur bei jungen Vorläuferzellen. Eine Doppelmarkierung mit Nestin wurde durchgeführt, um eine Einteilung neu generierter Zellen anhand ihres Entwicklungsgrades vornehmen zu können. Die Ausprägung von DCX wurde ab dem 7. postischämischen Tag sicher beobachtet. Doppelmarkierungen wurden daher ab PIT7 durchgeführt.

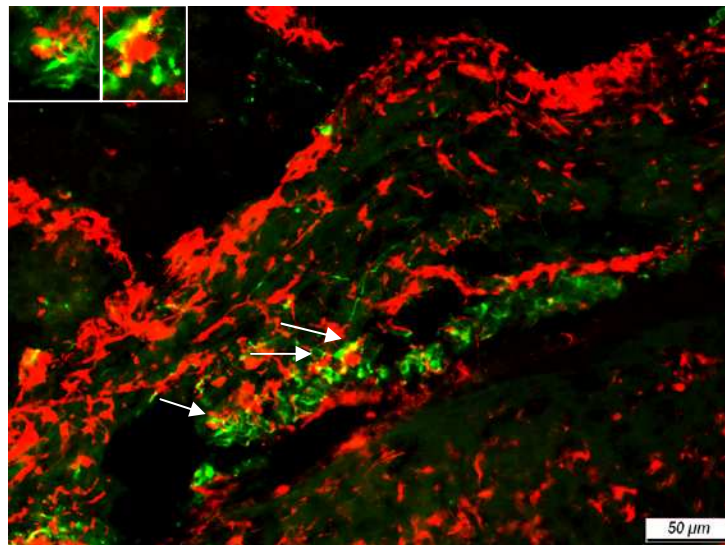
Sowohl in der Läsionsregion als auch in der ZSV konnten an PIT7 zahlreiche Zellen mit einer gleichzeitigen Exprimierung von DCX (grün) und Nestin (rot) entdeckt werden (Abb. 35).

Im GD wurden wenige vereinzelte DCX-positive wie auch Nestin-positive Zellen am 7. postischämischen Tag angetroffen, jedoch wurde keine Doppelmarkierung ersichtlich.

Sowohl im Läsionsgebiet und der ZSV als auch im GD wurden DCX- und Nestin einfachmarkierte Zellen auch nach PIT7 aufgefunden. Allerdings konnten zu den späteren Zeitpunkten keine Doppelmarkierungen detektiert werden.

Abb. 35 Progenitoren neuronaler Genese - Doppelmarkierung DCX/Nestin im Läsionsgebiet und angrenzender ZSV (MV200x)

PIT7



Darstellung einer Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung von neuronalen Progenitoren im Läsionsgebiet und angrenzender ZSV von Ischämietieren (Bregma -3,3mm) mittels DCX (grün) und Nestin (rot). Doppelt markierte Zellen (Pfeil, siehe auch Vergrößerungskästen) konnten einzig an PIT7 entdeckt werden.

3.4.4. Schicksal neu generierter Neurone

Doppelmarkierungen mit DCX und TUNEL wurden im Zeitraum zwischen PIT3 und PIT28 durchgeführt. Zielsetzung war die Untersuchung eines eventuellen apoptotischen Schicksals neu generierter Neurone.

Im unmittelbaren Zeitraum nach Ischämie-Induktion konnten im Bereich der Läsion zahlreiche und in der ZSV kaum Tunnel-positive Zellen sowie allgemein nur vereinzelt DCX-positive Zellen angetroffen werden. Zu späteren Postischämie-Zeiten fand man nur noch selten TUNEL-Markierung, während die DCX-Expression deutlich zunahm. Doppelmarkierungen von TUNEL und DCX traten zu keinem Zeitpunkt auf.

Im GD konnten bis zum 14. PIT immer wieder einzelne apoptotische Zellkerne hervorgehoben werden. Die DCX-Markierung prägte sich wie in der ZSV erst später deutlich aus. Auch hier konnten keine doppelt markierten Zellen entdeckt werden.

4. Diskussion

4.1. Tiermodell und Tierverhalten

Die klinische Relevanz zur Entwicklung eines neonatalen Schlaganfall-Modells wurde innerhalb der letzten Jahrzehnte zunehmend deutlicher, da diese Form der Läsion weitaus häufiger in Erscheinung trat als ursprünglich erwartet und Ursache einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen darstellt (Volpe et al. 1977, Rademakers et al. 1995).

Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen war die Induktion einer fokalen, kortikalen Läsion in 7 Tage alten Wistar-Ratten, basierend auf einem von der Pariser Forschungsgruppe „Hypoxie und Ischämie im sich entwickelnden Gehirn“ (HICD, Institut UMR 7102-CNRS) entwickelten Verfahren, welches erstmalig auch die Reperusionsperiode einschließt. Eine reproduzierbare ischämische Läsion in 7 Tage alten Rattenbabys konnte weder durch eine permanente ACMO allein noch durch eine transiente ACCO allein hervorgerufen werden. Bei Ratten ist die anastomotische Versorgung cerebraler Arterien untereinander so effizient, dass sie das cerebrale Einzugsgebiet der ACM vor ischämischer Läsion zu schützen vermag (Menzies et al. 1992).

Erst die Elektrokoagulation der ACM verbunden mit einem ipsilateralen 50-minütigen bis 1-stündigen Verschluss der ACC nach dem Verfahren des Pariser Forschungsinstituts (HICD, Institut UMR 7102-CNRS) führte zum Erfolg. Die Überlebensrate der Tiere in den ersten beiden Stunden nach Reperfusion lag über 90 Prozent, wobei Tiere mit Kombination einer permanenten ACMO und vorübergehendem Verschluss der ACC von weniger als 50 Minuten keine eindeutige Läsion entwickelten und von mehr als einer Stunde mehrheitlich verstarben (Renolleau et al. 1998).

Die Reperusionsperiode gilt als ein grosser Vorteil dieses Modells und wurde erreicht durch die Entfernung des ACC-Clips nach 50 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle. Die Wiederherstellung des Blutflusses erfolgte zu diesem Zeitpunkt über Anastomosen zwischen anterioren, medialen und posterioren Arterien im Einzugsgebiet der MCA (Renolleau et al. 2007). Die Reperfusion ahmt entscheidende Prozesse der menschlichen Neugeborenen HI-Encephalopathie nach, welche perinatal auftreten können. Bisher etablierte HI-Modelle vermochten zwar eine cerebrale Hypoxie mit entsprechender Hirnschädigung zu verursachen, jedoch keine vaskuläre Rezirkulation und können so nur bedingt die Vorgänge im menschlichen Gehirn imitieren und erklären. So kann der Reperusionsphase eine bedeutende Rolle bezüglich des postischämischen Schadensausmaßes beigemessen werden. Erst kürzlich

konnte mit Hilfe diffusionsgewichteter Magnetresonanztomographie nachgewiesen werden, dass die Reperfusion das Ödemvolumen zu begrenzen vermag (Fau et al. 2006). Ohne eine vaskuläre Rezirkulation würde sämtliches im Einzugsgebiet der ACM liegendes Gewebe sofort nekrotisch untergehen und ein Wiedergewinn der Organfunktion wäre unmöglich (Lo et al. 2003). Eine Rezirkulation kann heutzutage häufig durch die gute perinatale Intensivpflege erreicht werden. Die Wiederherstellung des Blutflusses steht somit bis heute im Mittelpunkt der Therapie.

Pathophysiologische Studien haben jedoch auch den gegenteiligen Effekt der Reperfusion beschrieben. So kann eine erneute Blutzirkulation nach ischämischer Periode weitere Zellnekrosen riskieren und die Wiederaufnahme der Organfunktion limitieren. Ursache dafür ist eine mikrovaskuläre Dysfunktion mit erhöhter Freilassung von Leukozyten und Endothelzellen, die wiederum ein Missverhältnis zwischen freien Radikalen und Stickoxid erzeugen. Folge ist ein gesteigertes Auftreten von Entzündungsmediatoren auch in Organteilen, die nicht im initialen Infarktgebiet liegen (Carden et al. 2000).

Die tatsächliche Bedeutung des wieder gewonnenen Blutflusses erscheint wesentlich größer für den Verlauf der cerebralen Schädigung zu sein als bisher vermutet und ist daher bei der Untersuchung neonataler cerebraler Ischämie zu berücksichtigen.

Die operierten Tiere konnten nach vollständigem Erwachen zu ihren Müttern zurück gesetzt werden. Erstaunlicherweise zeigten sie auch nach erfolgreich durchgeführter fokaler Ischämie nur anfängliche Unterschiede im Trink- und Bewegungsverhalten im Vergleich zu ihren ungeschädigten Geschwistern, denn bereits nach wenigen Tagen waren sie nahezu unauffällig. Im Gegensatz zu den menschlichen Neugeborenen, die erhebliche Einbußen in Verhalten und Entwicklung verglichen zu gesunden Gleichaltrigen aufweisen, lassen junge Ratten bereits durch ihre äußere Erscheinung ersichtlich, hohe kompensatorische und plastische cerebrale Prozesse vermuten. Besonders beeindruckend waren häufig Läsionen von großem Ausmaß, die erst nach Tötung der Tiere sichtbar wurden und nur durch eine extrem rasche kontralaterale Funktionsübernahme erklärbar, kompensiert werden konnten.

4.2. Läsion und Zelltod infolge cerebraler Ischämie

Mit Hilfe der Cresyl Violet Methode konnte gezeigt werden, dass eine ischämische Periode zum progressiven Gewebeuntergang und folglich Kavitätsbildung führt. Diese Kavitätsbildung erscheint als ein den Jungtieren eigenes Phänomen, da bei Adulten die zerstörte Region mehrheitlich durch gliales Gewebe ersetzt wird (Ellison et al. 1999).

Astrozyten werden in Folge ischämischen Einflusses reaktiv und wandern beim Erwachsenen, eine natürliche Barriere bildend, zur Grenze der Läsion und verhindern so ein übermäßiges, aktives Eindringen insbesondere von Makrophagen. Weiterhin können abgestorbene Neurone durch ein dichtes gliales Netz ersetzt werden. Astrozyten im postnatalen Rattenhirn haben vermutlich eine erhöhte Vulnerabilität und folgen entweder auch dem apoptotischen Pfad oder sind noch nicht fähig, ein stabiles Netzwerk zu bilden (Biran et al. 2006). So können beim Neugeborenen Makrophagen und andere Phagozyten in das geschädigte Gewebe eindringen und so unter anderem aktiv zur Kavitätsbildung beitragen (Benjelloun et al. 2003).

Weiterhin wurde bei einem Drittel der untersuchten Tiere über Ferneffekte ein Verlust neuronaler Zellen im ipsilateralen Hippocampus sichtbar. Dieses zelluläre Absterben in einem nicht direkt vom Infarkt betroffenen, jedoch stark umgrenzten Areal lässt auf einen Verlust cortiko-hippocampaler Projektionsfasern schließen.

Möglicherweise waren diese hippocampalen Nervenzellen Glieder des neuronalen Schaltkreises apoptotischer Cortexzellen, welche aufgrund fehlender Fremdstimuli ihre Lebensfunktion nicht mehr aufrecht erhalten konnten. Das Auftreten bei nur einem Drittel der Tiere kann durch individuelle Unterschiede im Entwicklungsgrad begründet werden. Möglicherweise besteht bei den übrigen zwei Dritteln noch keine ausreichende Konnektivität zwischen corticalen und hippocampalen Neuronen, so dass der Hippocampus durch das cortiko-neuronale Absterben noch nicht in Mitleidenschaft gezogen werden konnte. Darüber hinaus dürfen anatomische Unterschiede des Einzugsbereiches der MCA nicht außer Acht gelassen werden. So können die untergegangenen Nervenzellen des Cortexes auch in andere Hirnregionen projizieren. Doch im Gegensatz zum Neugeborenen scheinen Projektionsfasern vermehrt im Erwachsenenalter für die Vermittlung von (apoptotischen) Ferneffekten relevant zu sein (Witte et al. 2000).

Morphometrische Messungen der Hemisphären und ihr statistischer Vergleich ergaben im frühen postischämischen Zeitraum von PIT1 bis PIT3 keine Größenunterschiede von ipsi- und contralateraler Seite. Jedoch fand man eine deutliche Differenz bei Tieren mit einer längeren Reperusionsperiode von 10 bis 21 Tagen (PIT10-PIT21).

Der Vergleich von contralateralen Hemisphären und Kontrollen erzielte ein umgekehrtes Verhältnis. Zu den frühen Zeitpunkten war die contralaterale Seite von Ischämietieren statistisch deutlich kleiner als die Hemisphären von Kontrolltieren, bei der späteren Altersgruppe glichen sie sich dann nahezu an.

Einerseits erklärt sich diese frühe contralaterale GröÙenverminderung durch den globalen Effekt, erzeugt durch den operativen Stress sowie die Läsion selbst. Ihre Auswirkungen beschränken sich natürlich nicht auf eine Hirnhälfte allein, sondern beziehen den gesamten Organismus mit ein. So geht die reduzierte cerebrale Oberfläche häufig mit einer umschriebenen Gewichtsabnahme in den ersten postischämischen Tagen einher, die sich aber ebenfalls mit zunehmender Reperfusionszeit dem Kontrolltier-Gewicht annähert und somit auf eine allgemeine Regeneration schließen lässt (Spiegler et al. 2007). Zum anderen zeigten Untersuchungen im unmittelbaren Zeitraum bis 24h nach Ischämie ein apoptotisches Absterben von Zellen auch in der weißen Substanz der contralateralen Hirnhälfte. Dieser mit der TUNEL-Methode detektierte Zellverlust erwies sich in den ersten postischämischen Stunden (maximal zu PI12h) erstaunlicherweise als ebenso massiv wie in der eigentlich vom Infarkt betroffenen Hirnseite und führte somit natürlich auch zu einer aktiven Flächenverminderung, vermutlich verursacht durch den Verlust von interhemisphärischen Zellverbindungen.

Die Angleichung der contralateralen und Kontrolltier-HemisphärengroÙe zu späteren Überlebenszeitpunkten spricht für eine wesentlich schnellere Erholung der Gegenseite vom globalen Einfluss der Ischämie als die Läsionsseite. Auch die beschriebenen starken proliferativen Vorgänge in ZSV und GD sowie die Migration von Neuroblasten bestätigen eine hohe regenerative Fähigkeit. Die contralaterale Hemisphäre besitzt also eine wesentlich größere Bedeutsamkeit im Rahmen der Wiederherstellung bzw. Ersetzung cerebraler Funktion als bislang angenommen und könnte ein weiteres Ziel zukünftiger Therapie darstellen.

Die TUNEL-Methode wurde zur Detektion eines apoptotischen Zelltodes infolge Ischämie eingesetzt, wobei ein zeitlich progressiver Verlauf zu verzeichnen war. Generell können die ischämisch geschädigten Zellen auf nekrotischem oder apoptotischem Wege sterben. Entscheidend sind hierbei Natur und Intensität des Stimulus sowie Typ und Entwicklungsgrad der betreffenden Zelle (Leist und Nicotera 1998). Nekrose tritt nach akutem, permanentem Gefäßverschluss auf, wobei Apoptose einer mildereren, kurzzeitigen Schädigung folgt (Dirnagl et al. 1999, Kametsu et al. 2003).

Das in dieser Studie verwendete Tiermodell zeigte im Läsionsgebiet überwiegend apoptotische Neurone, die u.a. auch durch die Betrachtung der Morphologie in Cresyl Violet gefärbten Hirnschnitten beurteilt werden konnten. TUNEL-positive Zellen zeigten hier eine typische Chromatinkondensation sowie eine Fragmentierung in „apoptotic bodies“. Noch

nicht ausdifferenzierte, unreife Neurone besitzen offensichtlich eine erhöhte Neigung zum programmierten Zelltod, denn beim adulten ischämischen Hirn mit ausdifferenzierten Nervenzellen findet man sowohl apoptotische als auch eine Vielzahl nekrotischer Zellen (Renolleau et al. 1998, Nakajima et al. 2000). Im Unterschied zu den apoptotischen, zeichneten sich die nekrotischen Zellen vor allem durch eine mikroskopisch sichtbare Kernpyknose aus.

Zellen in Apoptose konnten wie beschrieben auch außerhalb des Läsionsbereiches sehr frühzeitig in der weißen Substanz sowie in den obersten Cortexschichten jeweils beider Hirnhälften detektiert werden.

Für Ursachen bzw. Auslösemechanismen vor allem des contralateralen Ferneffektes kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. So findet einerseits im gesamten Hirn die Freisetzung spezifischer Transmitter und inflammatorischer Botenstoffe statt, die entsprechend sensitive bzw. vulnerable Zellen ebenfalls in die Apoptose treiben. Andererseits kann auch hier der Stimulus-Verlust durch wenige bereits ausgebildete interhemisphärische Afferenzen von Bedeutung sein.

Weiterhin spielt diese frühe diffuse Apoptose in Folge ischämischen Einflusses auch eine Vorbotenrolle der folgenden proliferativen Phase (Daval et al. 2004, Daval und Vert 2004), ähnlich der Apoptose in der physiologischen Hirnentwicklung zur Steuerung von Zellzahl und proliferativer Zellregeneration, denn 90% der gebildeten Neuroblasten gehen pränatal genetisch programmiert zugrunde (Blaschke et al. 1996).

Darüber hinaus wurde berichtet, dass in situ end labeling, wie mit der TUNEL-Methode erfolgt, nicht in jedem Falle für Apoptose sprechen muss. Auch morphologisch intakte Zellen konnten mit einer Kernfragmentierung und somit positiver Markierung beobachtet werden (Aschoff et al. 2000). Insbesondere die hervorgehobenen Zellen in ipsilateralen infarktfernen Bereichen sowie im contralateralen Cortex könnten daher fragmentierte Kerne im Rahmen einer mitotischen Zellvermehrung tragen. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da in den ersten postischämischen Tagen eine signifikante beidseitige Flächenverminderung sichtbar wurde. Auch das unauffällige Verhalten der Tiere nach Ischämieinduktion trotz makroskopisch sichtbarer Kavitätsbildung, spricht für eine frühe Kompensation im Sinne einer Funktionsübernahme durch bestehende ungeschädigte neuronale Regelkreise in anderen Hirnregionen. Der Zeitraum von wenigen Stunden würde nicht ausreichen, um aus proliferierenden Zellen neue effiziente Schaltkreise zu bilden. Weiterhin wurde das Maximum TUNEL-positiver Zellen in den ersten 24h nach Läsionierung ermittelt, während proliferative

Vorgänge (Ki67-positive Zellen) erst nach 24h detektiert wurden und ihre entsprechenden Maxima erreichten. Auch konnte eine hohe Korrelation TUNEL-positiver Zellen und gleichzeitiger Caspase-3-Positivität nachgewiesen werden (Zhu et al. 2000). Bei Caspase-3 handelt es sich um ein Schlüsselenzym der Apoptose-Induktion. Die durchgeführte TUNEL-Markierung spricht daher für den apoptotischen Charakter der markierten Zellen.

4.3. Vermehrtes Auftreten von Glia- und Progenitorzellen infolge Ischämie

Astrozyten nehmen sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Verhältnissen eine zentrale Stellung im cerebralen Zellgefüge ein. Durch die komplexen und hochdynamischen astroglial-neuronalen Interaktionen können Hirnfunktion und Überleben gesichert werden. Insbesondere in Folge einer Läsion wird diesem Zelltyp eine Protektor-Rolle zugeschrieben (Dirnagl et al. 2003).

Im hier beschriebenen Neugeborenen-Modell konnte eine erhebliche astrozytäre Antwort auf ischämische Einwirkung beobachtet werden.

Auffallend war die starke Invasion dieser Gliazellen im direkten Grenzgebiet zur Läsion an PIT2. Sie befanden sich wie beschrieben in einem reaktiven Zustand, primär sichtbar am veränderten Phänotyp (prall-hypertrophe Zellkörper, stark verkürzte und verdickte Prolongationen). Dieser mögliche Rückschritt in ein frühreiferes Stadium und die durch veränderte Gen-expression nun freigesetzten trophischen Faktoren können eine regenerations- und neuro-genesefreundliche Umwelt schaffen (Anderson et al. 2003). Den Astrozyten kann jedoch auch eine direkte Mitbeteiligung am Zelluntergang zugeschrieben werden. Gerade im Ödem-bildungs- und Entzündungsverlauf sollen sie über Regulation der Immunantwort sowie über Fehlregulation eigener spezifischer Kanalproteine (Aquaporine) aktiv fördernd wirken (Trendelenburg und Dirnagl 2005).

Auch an PIT7 waren in der infarktumgrenzenden Region noch immer zahlreiche Astrozyten mit nun wesentlich längeren Prolongationen zu verzeichnen. Dieses Bild entwickelte sich bis zu PIT28 zu einem dichten, scheinbar gut organisierten Netzwerk, der so genannten Glianarbe weiter. Doch auch die Ausbildung der Glianarbe kann als zweiseitig betrachtet werden. Zum einen begrenzt sie die Läsionseite und deren Ausbreitung in nicht vom Infarkt betroffene Regionen, zum anderen behindert sie die Regeneration von Zellen. Ursache dafür ist die Produktion von Proteoglycan-Matrixmolekülen durch reaktive Astrozyten und eine folgende Barrierebildung, die ein Neuauspräßen von Axonen verhindert (Trendelenburg und Dirnagl 2005).

Den Astrozyten kann daher nicht nur eine rein neuroprotektive Rolle zugeschrieben werden,

da sie auch zu einem möglichen Fehlschlagen der Regeneration beitragen.

Das Vorkommen von reaktiven Astrozyten in Folge Ischämie wurde auch in anderen nicht direkt vom Infarkt betroffenen Hirnregionen wie der ZSV und dem GD beschrieben. Eine akute Antwort bildet sich also über das gesamte Hirnparenchym aus. Möglicherweise tragen diese hier vorkommenden Astrozyten über die Freisetzung trophischer Faktoren zur Anregung von Proliferation und Neurogenese in diesen Gebieten bei.

Antikörperbehandlungen mit dem Intermediärfilament Nestin wurden mit dem Ziel der Beschreibung eines möglicherweise veränderten Auftretens und Verteilung von unreifen, teils undifferenzierten Elementen, den Vorläuferzellen, durchgeführt.

Im direkten Grenzgebiet des Insults fand man hervorgehobene Strukturen mit kurzen, dicken Prolongationen, die dem Bild reaktiver Astrozyten glichen. Markierungen von GFAP zeigten ebenfalls eine starke Immunopositivität in diesem Bereich, auch ihr morphologisches Bild stimmte überein. Schlussfolgernd handelt es sich in diesem Gebiet um Astrozyten, die auf Grund cerebralen Insultes eine reaktive Form und so dieses charakteristische Bild annehmen (Schmidt-Kastner und Humpel 2002). Vermutlich gehen sie hierzu in ein früheres unreifes Entwicklungsstadium über und exprimieren deshalb erneut das Protein Nestin (Dahlstrand 1994). Es handelt sich dabei folglich jedoch nicht um Progenitoren im eigentlichen Sinne, sondern um reife astrozytär differenzierte Zellen im reaktiven Ausnahmezustand.

Die in anderen Regionen wie dem GD bzw. auf contralateraler Hemisphärenseite beobachteten Nestin-positiven Zellen besaßen eine wesentlich feinere langgliedrige filamentöse Struktur. Dieser zweite Morphologietyp entspricht vermutlich echten Vorläufer- bzw. Stammzellen, die sowohl Ursprung von Neuronen, Astrozyten als auch Ependymzellen sein können (Li et al. 1999). Progenitoren konnten an PIT2 in Läsionsgebiet, ZSV und GD bei Ischämietieren ipsi- wie auch in verminderter Anzahl contralateral sowie auch bei Kontrolltieren beobachtet werden. Interessanterweise wurden am 7. postischämischen Tag Nestin-positive Zellen nur noch bei Ischämietieren im Bereich von Läsion und ZSV ersichtlich. Ein ischämischer Insult vermag also das Vorkommen von Vorläuferzellen zu erhöhen, welches wiederum einen potentiellen Ersatz untergegangenen Gewebes darstellt. Reife differenzierte Zellen verlieren ihre Nestinexpression im Rahmen des Entwicklungs- und Reifungsprozesses. So kann dieses Neurofilament beispielsweise im gesunden erwachsenen Gehirn nicht mehr aufgefunden werden (Dahlstrand et al. 1994).

4.4. Proliferation, Neurogenese und Migration

Bereits von Kokaia und Lindvall wurden im Jahre 2003 die ischämische Insult getriggerte Proliferation und Migration in den zeitlebens proliferativen Zonen der ZSV und des GD der erwachsenen Ratte beschrieben (Kokaia und Lindvall 2003). Bezugnehmend auf die vorliegende Arbeit konnte ebenfalls ein Proliferationsanstieg mittels Ki67-Markierung im Bereich der ZSV und des GD infolge cerebraler Ischämie der neonatalen Ratte nachgewiesen werden. Auffallend waren vor allem die zeitlich differenzierten Maxima zu PIT2, 7 und 28. Diese Wachstumsschübe waren beidseitig sowohl in ZSV als auch dem GD deutlich ausgeprägt und lassen eine vom Zelltyp abhängige spezifische Antwort vermuten.

Der erste Höchstwert an PIT2 spricht für eine primäre Zellvermehrung mit glioprogenitorischen Eigenschaften. Im direkten Bereich der Läsion und angrenzender ZSV sowie dem ipsi- und contralateralen GD konnten zu diesem Zeitpunkt zahlreiche proliferierende Astrozyten (Ki67- und GFAP-positiv) angetroffen werden. Andere Studien am selben Tiermodell ermittelten an PIT2 eine Co-Expression Ki67-positiver Zellen von GFAP oder NG2, eines von oligodendrozytischen Progenitoren bzw. Polydendrozyten ausgebildeten Proteoglykansulfats (Daval et al. 2004). Diese Zelltypen geben wiederum Astrozyten bzw. Oligodendrozyten ihren Ursprung wie erst kürzlich für das ipsi- und contralaterale Corpus Callosum berichtet wurde (Biran et al. 2006). In diesem Zusammenhang sollte eine weitere Hypothese insbesondere im Hinblick auf den GD näher betrachtet werden. So ist eine weitere Form der Neurogenese über das Stadium von Vorläuferzellen mit astrozytären Eigenschaften (Expression von GFAP) denkbar (Seri et al. 2001, Kempermann et al. 2004). Möglicherweise könnten auch die hier proliferierenden GFAP-positiven Zellen neuen Neuronen und nicht Astrozyten allein Ursprung geben. Weiterhin wurden an PIT2 zahlreiche proliferierende Vorläuferzellen (Ki67- und Nestin-positiv) in ZSV und GD beschrieben und weisen auf eine ischämie-induzierte Stimulation der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen hin (Jin et al. 2001, Zhang et al. 2001, Yang und Levison 2006).

In Folge ischämischer Einwirkung kommt es also nach nur kurzer Reperfusionsperiode zu einer zeitlich begrenzten mitotischen Zellvermehrung von Progenitoren und Astrozyten. Bei beiden Zellformen ist aus den genannten Gründen eine spätere gliale, aber auch neuronale Ausdifferenzierung zum möglichen Ersatz untergegangenen Gewebes vorstellbar.

Das zweite Proliferationsmaximum an PIT7 deutet auf eine sekundäre Antwort vorzugsweise neuronalen und oligodendrozytischen Charakters hin. Dies stimmt überein mit anderen Studien, die zeigten, dass aktivierte neurale Stamm- bzw. Progenitorzellen eine erhöhte Kapazität zur Produktion von Neuronen und Oligodendrozyten besitzen (Yang und Levison 2006).

Außerdem konnte anhand dieser Arbeit ein stark vermindertes Auftreten von proliferativen Astrozyten und proliferativen Progenitoren an PIT7 verzeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde erstmalig auch eine eindeutige Markierung neu gebildeter Neuroblasten (DCX-positiv) beschrieben. Weiterhin wurden in verschiedenen Insult-Tiermodellen sowohl für die ZSV als auch für den GD eine am 7. postischämischen Tag einsetzende bzw. gipfelnde Neurogenese geschildert (Plane et al. 2004, Ong et al. 2005).

Der dritte eher überraschende Höchstwert an PIT28 konnte keinem eindeutigen Zelltyp zu geordnet werden. Weder Astrozyten (GFAP), noch Vorläuferzellen waren in den entsprechenden Zonen zu diesem späten Zeitpunkt mit den durchgeführten Methoden in doppelter Markierung detektierbar. Es handelt sich vermutlich um neu generierte Oligodendroglia wie in einigen Studien berichtet wurde (Ong et al. 2005, Levison et al. 2003, Zaidi et al. 2004).

Jedoch wurde in einer Untersuchung von Springmäusen mit ischämischem Insult an PIT30 eine immer noch dreifach höhere Zahl an Zellen positiver BrdU-Markierung (5-Bromo-2-deoxyuridine), einem weiteren Mitosemarker zur Neurogenesedetektion (Gratzner 1982) im Hippocampus beschrieben, wovon über 67% auch NeuN-positiv (reifer neuronaler Marker) waren (Bingham et al. 2005). Eine späte neuronale Proliferation von möglicherweise reiferen bereits vollständig differenzierten Zellen ist daher generell denkbar und erfordert weitere Experimente.

Alle beschriebenen Maxima der Infarktseite spiegelten sich interessanterweise in abgeschwächter Form auch auf der contralateralen Hemisphäre wider. So scheinen infarktferne Regionen weitaus stärker in postischämische regenerative Prozesse involviert zu sein als bisher vermutet. Auslöser für diese proliferative Aktivität könnten zum einen hirnglobale Veränderungen wie z.B. chemokinetische Einflüsse sein, zum anderen gezielte Ferneffekte ausgehend von der Läsionsseite oder aber der diffuse apoptotische Zelltod, wie er für die Gegenseite in den ersten postischämischen Stunden beschrieben wurde.

Die teils beobachtete zelluläre Vermehrung in der ZSV und dem GD von Kontrolltieren lässt sich auf die natürliche Hirnentwicklung und –ausreifung zurückführen, die zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen war und erst im Alter von circa 14 Tagen auf ein Basisniveau absank.

Im Rahmen dieser Studie konnten Neurogenese sowie Migration nach neonataler Ischämie nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des microtubulinassoziierten Proteins DCX wurde zwischen PIT7 und PIT10 eine

deutliche Neurogenese in der ipsilateralen ZSV beschrieben. Die markierten Zellkörper zeichneten sich durch lange markante Prolongationen aus, die auf ihre folgende migratorische Aktivität hinwiesen. Im Bereich der ZSV findet auch im gesunden Organismus zeitlebens eine basale neuronale Neubildung statt. Normalerweise migrieren diese Zellen entlang des rostralen Migrationsstromes in den Bulbus olfactorius, wo sie sich in Interneurone differenzieren (Luskin et al. 1993). Doch in Folge ischämischen Insultes können offensichtlich wie zu PIT14 erstmals beobachtet, einige dieser Zellen einen anderen Weg einschlagen und in Richtung geschädigter Hirnregionen wandern. Auch wenn es sich scheinbar nur um eine kurzzeitig erhöhte Initiation von Neurogenese handelte (zwischen PIT7 und PIT14), konnten migrierende Zellen selbst nach 4 und 6 Wochen in auffallender Nähe zur Läsion entdeckt werden, sodass man von einem andauernden Geschehen sprechen kann. Eine Weiterentwicklung und ein neuronales Überleben sind vorstellbar im Penumbrabereich der Läsion, nicht aber im direkten Läsionsgebiet, da massiv schädigende Prozesse infolge cerebraler Ischämie zu einer permanenten und scheinbar irreversiblen Kavitätsausbildung aller Schichten des parietalen Cortex führen (Biran et al. 2006, Joly et al. 2003).

Auch im Bereich der contralateralen ZSV wurde eine zeitlich verzögert einsetzende Neurogenese ersichtlich. Nach einem Maximum zwischen PIT10 und PIT14 fiel sie aber hier kontinuierlich ab. Nur zum Zeitpunkt PIT14 sah man einzelne migrierende Zellen. Man kann daher von einer vorhandenen, aber abgeschwächten contralateralen Insultantwort sprechen.

Neurogenetische Aktivität in den untersuchten Kontrolltieren lässt sich auf die natürlichen Entwicklungsprozesse im heranreifenden Gehirn zurückführen. So wurde bereits 1979 Neurogenese im Bulbus olfactorius beschrieben, die ihr Maximum in den ersten zwei postnatalen Wochen erreicht (Rosselli-Austin et al. 1979). Diese ausgeprägte Antwort auf ischämischen Insult mit Neurogenese und Migration insbesondere in dieser Hirnregion erscheint daher nicht verwunderlich und verweist auf ein hohes neuronales Reparaturpotential im neonatalen Gehirn.

Den Beobachtungen dieser Studie zufolge werden im postischämischen Gehirn vermehrt Neurone gebildet, die dann im Stande sind, in geschädigte Gebiete zu wandern mit dem Ziel untergegangene Nervenzellen zu ersetzen.

Im GD konnte ebenfalls Neurogenese verzeichnet werden. Wobei deutlich markierte Zellkörper bei den Ischämietieren beidseits erst zu PIT10 auftraten und ab PIT14 Prolongationen ausbildeten. Kontrolltiere im entsprechenden Alter zeigten nur geringe Markierung. Erst zu PIT21 schienen sie den Neurogenese-Vorsprung der Insulttiere

aufzuholen und vermittelten ein Bild gleicher maximaler Nervenzell-Neubildung.

Erstaunlicherweise konnten kaum Unterschiede im Ausmaß der neuronalen Vermehrung zwischen den untersuchten Tiergruppen festgestellt werden. Lediglich ein früheres Einsetzen und langsames Abflauen bei der Ischämiegruppe war auffällig. So scheint der ischämische Insult auch hier einen Triggerreiz auszuüben, der wahrscheinlich über trophische Faktoren den Beginn der sonst auch physiologisch im Rahmen der Entwicklung auftretenden Neurogenese vorzuziehen und zu prolongieren weiß. Wie bereits nach Ischämie am Erwachsenen-Modell beschrieben, wird Neurogenese in proliferativen Zonen wie der Zona subgranularis des GD auch ohne direkten hippocampalen Schaden induziert (Kokaia und Lindvall 2003). Allerdings war hier in Folge neonataler Ischämie keine überschießende Reaktion mit wesentlich stärkerer Zellvermehrung im Vergleich zu den Kontrolltieren hervorgerufen worden.

Die gewonnenen Erkenntnisse insbesondere bezüglich der Infarktseite sprechen für einen insultgetriggerten progredienten Verlauf von primärer Neurogenese, sekundärer Migration in geschädigte Randbezirke der Läsion und erheben Anspruch auf die Frage nach einer möglichen tertiären Weiter- bzw. Ausreifung dieser Neuroblasten.

Bereits zu PIT21 wurden im Penumbra-Gebiet Zell-Gruppen beobachtet, deren Phänotyp verändert schien verglichen mit den frühen DCX-positiven Zellen nahe der ZSV. Teils konnten monopolare Zellen mit nun extrem langem Axon an der Grenze zur Kavität gesichtet werden, die in ihrer morphologischen Erscheinung kortikalen Pyramidenzellen ähnelten. Andere Zellen verkürzten ihre ursprünglich langen Prolongationen, häufig waren sie nun bi- oder sogar multipolar. So weist dies auf das Ende der Migration und ein verändertes, möglicherweise höheres neuronales Entwicklungsstadium als Folge des Reifungsprozesses hin. Ob diese Neurone tatsächlich ausreifen und überleben, konnte anhand dieser Studie nicht ermittelt werden. Sicher ist, dass diese Zellen den massiven Zellverlust innerhalb der progressiv entstehenden Kavität nicht ersetzen können (Joly et al. 2003, Biran et al. 2006). Die Abklärung ihrer Bedeutung für Penumbra und contralaterale Cortexbereiche bleibt fortführenden Studien überlassen.

Doppelmarkierungen von DCX und Nestin wurden durchgeführt, um eine weitere Einteilung neu generierter Zellen in Folge Ischämie vornehmen zu können. Das Intermediärfilament Nestin wird gewöhnlicherweise von neuroepithelialen Stammzellen exprimiert. Auch DCX findet man bei Vorläuferzellen. Jedoch sind diese bereits für die neuronale Linie determiniert.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurden lediglich zu PIT7 im Bereich von ZSV und Läsionsgrenzgebiet doppelt markierte Zellen detektiert. Diese Zellen können als eine neuronale Entwicklungszwischenstufe betrachtet werden. So beschrieb auch Kempermann 2004 im GD der erwachsenen Ratte Zellen mit vergleichbaren phänotypischen Merkmalen. Es könnte sich um einen neuronalen Entwicklungspfad von Zellen handeln, die sich aus Nestin-positiven Stamm- bzw. Progenitorzellen über die unreife DCX-Vorstufe schließlich zu vollwertigen Neuronen ausdifferenzieren. Die Nestin- und DCX-positiven Zellen stellen dabei eine Intermediärstufe zwischen phänotypisch noch nicht determinierten Stammzellen (Nestin-positiv/DCX-negativ) und bereits neuronal determinierten und sich neuronal fortentwickelnden Zellen (Nestin-negativ/DCX-positiv) dar (Kempermann et al. 2004).

Das Auftreten dieser Zellen nur zum Zeitpunkt PIT7 lässt sich durch gesamtheitliche Vorgänge in diesem neonatalen Modell erklären. Zahlreiche Nestin-positive Vorläuferzellen konnten an PIT2 angetroffen werden, die teilweise sogar proliferierten d.h. ebenfalls Ki67-positiv waren. Eine Woche nach Ischämieinduktion (PIT7) wurden keine proliferierenden Vorläuferzellen mehr entdeckt, jedoch traten erstmals DCX-positive Zellen auf, die höher entwickelten neuronalen Vorläuferzellen. Ein Teil davon co-exprimierte noch Nestin. Zu späteren Zeitpunkten wurden nur noch einfach DCX-positive Zellen sichtbar. Mit der Überwindung dieses Intermediärschrittes wird eine neuronale Weiterentwicklung und Ausreifung denkbar.

Die innerhalb dieser Studie durchgeführten Experimente lassen auf eine hohe Plastizität sowie ein hohes Regenerationspotential des neonatalen Rattenhirnes schließen. Doch Initiation proliferativer Prozesse sowie neuronale Weiterentwicklung allein lassen noch nicht von einer erfolgreichen Regeneration sprechen. Schlüsselkriterien hierfür sind zum einen das Überleben dieser neu generierten Zellen und wenn dieses Kriterium erfüllt ist, die erfolgreiche Integration in bestehende bzw. die Bildung neuer neuronaler Netzwerke.

Als ein abschließendes Experiment galt daher die Doppelmarkierung DCX/TUNEL zur Erkennung möglichen Absterbens neuronaler Vorläuferzellen. Diese Markierung wurde für sämtliche Reperfusionzeiten durchgeführt, zeigte aber zu keinem Zeitpunkt ein positives Ergebnis. Einfach TUNEL-positive Zellen konnten nur unmittelbar nach Ischämieinduktion und vereinzelt zu PIT14 im GD dargestellt werden. Eine akute Apoptose von unreifen Neuronen wurde mit der TUNEL-Methode also nicht ermittelt und lässt verschiedene

Vermutungen zu. So könnten diese Zellen einerseits einen reifen neuronalen Phänotyp entwickeln und entweder sich in bestehende Schaltkreise integrieren oder zu späteren Zeitpunkten als den hier untersuchten absterben. Jedoch im Gegensatz zu erwachsenen Insultmodellen (Arvidsson et al. 2002, Parent et al. 2002) wurden zumeist im an die ZSV angrenzenden geschädigten Striatum neonataler HI-Modelle vier Wochen nach Läsionsinduktion keine neu gebildeten reifen Neurone mehr identifiziert (Ong et al. 2005). Man vermutet daher, dass diese geschädigten Gebiete auf diesem Entwicklungsniveau kaum günstige Voraussetzungen besitzen um Ausreifung und Überleben der neu gebildeten Neurone zu sichern (Ong et al. 2005). Schuld daran könnten das Fehlen von trophischen Faktoren sowie das Fehlen von Verbindungen zu anderen Zellen sein (Arvidsson et al. 2002).

Andererseits wurden im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen zwischen PIT21 und PIT28 im direkten Läsionsgrenzgebiet DCX-positive bi- bzw. multipolarverzweigte Zellen beobachtet, die aufgrund dieser morphologischen Zeichen so ein Ende der Migration, einen höheren Reifegrad sowie voraussichtliche Kontaktaufnahme zu anderen Zellen signalisierten. Auch das Fehlen von TUNEL-positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt spricht eher für ein Weiterbestehen als den möglichen Zelltod. Doch genaue Kenntnis über das tatsächliche Schicksal dieser neu gebildeten Neurone kann nur durch weitere vertiefende Studien erbracht werden.

Im Jahre 2004 versuchten Kempermann und Kollegen ein Schema allgemeingültiger Voraussetzungen neuronaler Funktionalität am Erwachsenen-Modell zu erstellen. Ihren Ausführungen zufolge spiegelt sich diese auf drei verschiedenen Ebenen wieder: primär auf zellulärer Ebene (Ausbildung neuronaler Marker und Langzeitüberleben der einzelnen Zelle), sekundär auf Netzwerk-Ebene (Integration in bestehende Netzwerke mit Ausbildung von Axonen, Dendriten und Synapsen unter den Zellen) und tertiär die systemische Ebene (bezogen auf kognitive Fähigkeiten des Organismus) (Kempermann et al. 2004).

Am Modell der erwachsenen Ratte konnten Proliferation und Migration von Progenitoren in die CA1-Region des Hippocampus zur Ersetzung verletzter Pyramidalneurone demonstriert werden. Wichtig ist hierbei, dass die regenerierten Neurone in den hippocampalen Schaltkreis integriert zu sein schienen, welches im Zusammenhang mit der Reduzierung neurologischer Defizite stand (Nakatomi et al. 2004).

Denkbar ist diese funktionelle Regeneration auch am stark plastischen, hoch proliferativ aktiven Gehirn des Neugeborenen. Insbesondere die Beobachtung von Proliferation und Neurogenese auch auf contralateraler Seite, die in ihrer Morphologie scheinbar

weiterentwickelten Neurone am Rande der Kavität 3 bis 4 Wochen nach Ischämieinduktion sowie die bereits nach wenigen Tagen in ihrem Verhalten unauffälligen geschädigten Tiere verglichen mit ihren gesunden Geschwistern könnten ein Hinweis auf eine funktionelle Reorganisation infolge Ischämie sein. Für den sicheren Nachweis des tatsächlichen Überlebens und der Funktionalität neu gebildeter Neurone sind jedoch weitere Experimente erforderlich.

5. Ausblick

Trotz zahlreicher wissenschaftlicher Veröffentlichungen im Bereich des adulten Schlaganfalls in den letzten Jahrzehnten besteht noch immer ein erheblicher Mangel an Informationen zur Situation bei Kleinkindern nach perinataler cerebraler Ischämie. Diese Form der neonatalen Encephalopathie wird zumeist durch eine schwere intrauterine Asphyxie hervorgerufen und stellt eine der häufigsten Ursachen entwicklungsneurologischer Langzeitdefizite bei Kindern dar. Ihr klinisches Bild äussert sich häufig in cerebraler Lähmung, mentaler Retardierung, Lernschwäche und Formen der Epilepsie. Zur Vorbeugung oder Ausmaßminimierung dieser Krankheitsbilder bedarf es grundlegender pathophysiologischer Erkenntnisse und Therapiestrategien.

Die intensivmedizinische Therapie der hypoxisch-ischämischen Encephalopathie beschränkte sich bisher hauptsächlich auf die Eindämmung des pathophysiologischen Geschehens. So stand die Behandlung von Kreislauf, Gasaustausch, Hirnödem und ggf. begleitender Infektionen, Konvulsionen und die Vermeidung einer Hyperthermie bislang berechtigt im Vordergrund (Berger et al 2001). Doch das Fortbestehen einer großen Bandbreite neurologischer und kognitiver Langzeitdefizite lässt die Notwendigkeit von sekundären Maßnahmen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Im Rahmen dieser Studie konnten globale Auswirkungen einer fokalen cerebralen Ischämie auf das Gehirn der neonatalen Ratte beschrieben werden. Das gute Verständnis der zellulär-pathologischen und autoregenerativen Vorgänge sowie ihrer Zusammenhänge könnte mit Hilfe dieser und fortführender Untersuchungen eine erhebliche Verbesserung des klinischen Bildes schaffen. So stellt sich bereits jetzt die Frage, an welchen Stellen zukünftig therapeutisch interveniert werden könnte.

Sich in Diskussion befindliche sekundäre Maßnahmen wie beispielsweise die Einstellung einer Hypothermie (Shankaran et al., 2005) oder die Verwendung von NMDA-Antagonisten sind derzeit experimentellen Charakters und weiteren klinischen Studien vorbehalten, ebenso die Kombination physikalisch-pharmakologischer Maßnahmen.

Einen weiteren möglichen Ansatz repräsentiert dabei der Eingriff in die Apoptosekaskade, um das massive Zellsterben einzudämmen bzw. gar nicht erst auftreten zu lassen.

Darüber hinaus besteht dringende Relevanz zu einer kontrollierten Reperfusion. Einerseits verhindert eine erneute Blutzirkulation im Infarktgebiet, wie mit dem hier verwendeten Tiermodell beschrieben, übergreifende Zellnekrosen, andererseits werden in nicht direkt

insultbetroffenen Regionen zusätzliche Zellnekrosen riskiert und die Wiederaufnahme der Organfunktion limitiert. Insbesondere die Mikrovaskulation müsste daher streng überwacht werden, um einer erhöhten Leukozyten- und Endothelzellinvasion, basierend auf einer vaskulären Dysfunktion, vorzubeugen. Die anti-inflammatorische Behandlung stünde hier im Vordergrund.

Im Weiteren stellt die gezielte Aktivierung von Proliferation und Neogenese verschiedener Zelltypen einen aussichtsvollen Ansatz zur Therapie dar. In diesem Sinne gilt großes Interesse den neurotrophen Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF (nerve growth factor) und FGFs (fibroblast growth factors). Diese sind bereits unter physiologischen Bedingungen unabdingbar für das Gedeihen und Überleben von Neuronen. Insbesondere im pathologischen Organzustand können sie neuroprotektiv intervenieren und dem neuronalen Untergang Einhalt gebieten. Darüber hinaus fördern sie Wachstum, Differenzierung, Reifung und neuronales Überleben (Hossain 2005). Auf diese Weise könnte die globale Stimulation zur vermehrten Bildung oder auch die lokale Injektion von Wachstumsfaktoren mit einem erheblichen Anstieg erfolgreicher neuronaler Regeneration einhergehen und so das klinische Bild entscheidend verändern. Auch die vermehrte Bildung von Progenitorzellen und deren neuronale Differenzierung könnten mit Hilfe spezifischer Wachstumsfaktoren günstig beeinflusst werden.

Ebenfalls sollte der glialen Zellkomponente verstärkt Aufmerksamkeit gewidmet werden, denn auch hier spielen sowohl den Krankheitsverlauf positiv als auch negativ beeinflussende Faktoren eine Rolle. Es könnten Strategien entwickelt werden, um ein Aussenden proapoptotischer Signale durch Astrozyten zu verhindern, andererseits sie aber zu verstärkter Wachstumsfaktorsekretion anzuregen.

Ein weiteres Ergebnis dieser Studie bewies, dass auch der contralateralen Hemisphärenseite eine überaus hohe Bedeutung zur Wiedererlangung der cerebralen Funktionalität zukommt. So sollten regenerative Prozesse gezielt auch hier über die genannten Methoden gefördert werden, da funktionelle Kompensation in der frühen postischämischen Zeit nur über die Infarktgegenseite erklärbar sind und Zellverluste im Bereich der Kavität irreversibel bleiben. Der Erkenntnisgewinn dieser Untersuchungen bietet zahlreiche Ansätze zur Therapie, die in weiteren Studien geprüft und weiterentwickelt werden müssen. Vor allem jedoch die frühe klinische Diagnostik, ein über alles entscheidendes Kriterium, einschließlich der möglichen Prävention einer Ischämie bei Risikoschwangerschaften sowie die Kombination verschiedener Therapiestrategien erscheinen viel versprechend zur langfristigen Verdrängung des klinischen Bildes neurologischer Defizite infolge neonataler Encephalopathie.

Literaturverzeichnis

- Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson S. 2003
Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res*, 28:293-305.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Medicine*, 8(9):963-970.
- Aschoff AP, Günther E, Jirikowski GF. 2000. Tissue transglutaminase in the small intestine of mouse as a marker of apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation. *Histochem Cell Biol*, 113:313-317.
- Benjelloun N, Joly LM, Palmier B, Plotkine M, Charriaut-Marlangue C. 2003. Apoptotic mitochondrial pathway in neurons and astrocytes after neonatal hypoxia-ischemia in the rat brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 29(4): 350-360.
- Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. 1999. *Brain Res Reviews*, 30:107-134.
- Berger R, Garnier Y, Jensen A. 2001. Perinatale Neuroprotektion: Ist eine Senkung hypoxisch-ischämischer Hirnschäden möglich? *Deutsches Ärzteblatt* 98, 17: A-1124 / B-958/C-898.
- Bingham B, Liu D, Wood A, Cho S. 2005. Ischemia stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells. *Brain Res*, 1058:167-177.
- Biran V, Joly LM., Héron A, Vernet A, Véga C, Mariani J, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. 2006. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain. *Exp Neurol*, 199:103-112.

- Blaschke AJ, Staley K, Chun J. 1996. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex, *Develop*, 122:1165-1174.
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn G. 2003. Transient Expression of Doublecortin during adult Neurogenesis, *J of comparative Neurol*, 467:1-10.
- Cameron HA, McKay R. Stem cells and neurogenesis in the adult brain. 1998. *Curr Opin in Neurobiol*, 8:677-680.
- Carden DL, Granger DN. 2000. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190:255-266.
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U, Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many but not all, regions of developing central nervous system. 1994. *Dev Brain Res*, 84:109-129.
- Daval JL, Pourié G, Grojean S, Lièvre V, Strazielle C, Blaise S, Vert P. 2004. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. *Pediatr Res*, 55(4):561-567.
- Daval JL, Vert P. 2004. Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol*, 28(4):257-263.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22:391-397.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. 2003. Ischemic tolerance and endogenous Neuroprotection. *Trends Neurosci*, 26:248-254.
- Ehrmann J, Kolár Z, Mokry J. 2005. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol*, 58:222-223.

- Ellison JA, Barone FC, Feuerstein GZ. 1999. Matrix remodelling after stroke. De novo expression of matrix protein and integrin receptors. *Acad Sci*, 890:204-222.
- Fagan AM, Gage FH. 1994. Mechanism of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Neurosci*, 58(4):705-725.
- Fau S, Po C, Mariani J. 2006. Effect of reperfusion after cerebral ischemia in P7 rats using diffusions-weighted MRI monitoring (Abstract). *Proceedings of Neuroscience 2006*, Society for Neuroscience, held in Atlanta, GA, October 14-18, 2006. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2006:282.9.
- Gould E, Tanapat P. 1997. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of adult rat. *Neurosci*, 80(2):427-436.
- Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218:474-475.
- Hossain MA. 2005 Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain, *Epilepsy and Behavior*, 7:204-213.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:4710-4719.
- Joly LM, Benjelloun N, Plotkine M, Charriaut-Marlangue C. 2003. Distribution of poly(ADP-Ribosyl)ation and cell death after cerebral ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res*, 53:776-782.
- Kametsu Y, Osuga S, Hakim AM. 2003. Apoptosis occurs in the penumbra zone during short-duration focal ischemia in the rat. *J of cerebral blood flow and metabolism*, 23:416-422.

- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. 2002. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J of Neurosci Methods*, 115:97-105.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestone of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neurosci*, 27(8):447-452.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH. 2004. Functional significance of adult neurogenesis, *Curr Opin in Neurobiol*, 14:186-191.
- Kokaia Z, Lindvall O. 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults, *Curr Opin*, 13: 127-132.
- Leist M, Nicotera P. 1998. Apoptosis versus necrosis: the shape of neuronal cell death, *Exp Cell Res*, 239: 83-201.
- Levison SW, Druckmann SK, Young GM, Basu A. 2003. New Neural stem cells in the subventricular zone are a source of astrocytes and oligodendrocytes, but not microglia. *Dev. Neurosci*, 25:184-196.
- Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. 1998. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci*, 156:119-132.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA, 2003. Mechanism, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, 4:399-415.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11:173-189.
- McDonald HW, Behrens MI, Chung C, Bhattacharyya T, Choi DW. 1997. Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res*, 759:228-232.
- Menzies S, Hoff J, Betz A. 1992. Middle cerebral artery occlusion in rats: aneurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, 31:100-107.

- Mir Ahamed Hossain. 2005. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy and Behavior*, 7:204-213.
- Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. 2000. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 2000, 20(21):7994-8004.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Kirino T, Nakafuku M. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischaemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002, 110:429-441.
- Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. 2005. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *European J of Neurosci*, 2:1928-1941.
- Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. 2001. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis*, 8(2):207-219.
- Ohrt B, Riegel R, Wolke D. 1995. Langzeitprognose sehr kleiner Neugeborener, *Arch. Gynecol Obstet*, 215:480-492.
- Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. 2005. Hypoxic-Ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res*, 58: 600-606.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. 2002. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol*, 52: 802-813.
- Paxinos G, Watson C. 1982. *The Rat Brain in stereotaxic Coordinates*, Second Edition, New York: Academic Press.

- Plane JM, Liu R, Wang TW, Silverstein FS, Parent JM. 2004. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. 2004. *Neurobiol of Disease* 2004, 16:585-595.
- Rademakers R, Vanderknaap M, Verbeeten BJ, Barth P, Valk J. 1995. Central cortico-subcortical involvement: a distinct pattern of brain damaged caused by perinatal and postnatal asphyxia in term infants. *J Comput Assist Tomogr.* 19: 256-263.
- Renolleau S, Benjelloun N, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. 1997. Regulation of apoptosis-associated proteins in cell death following transient focal ischemia in rat pups, *Apoptosis.* 2:368-376.
- Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue, C. 1998. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat. *Stroke.* 29: 1454-1461.
- Renolleau S, Fau S, Goyenvallé C, Charriaut-Marlangue C. 2007. Sex, neuroprotection and neonatal ischemia, *Dev Med Child Neurol* 2007, 49(6):477-478.
- Ringelstein EB, Grond M, Busse B. 2006. German Stroke Society. *Int J of Stroke* 1 (1):45–46.
- Rosselli-Austin L, Altman J. 1979The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol,* 1:295-313.
- Schmidt-Kastner R, Humpel C. 2002. Nestin expression persists in astrocytes of organotypic Slice cultures from rat cortex. *Int J Dev Neurosci,* 20:29-38.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen B, Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J of Neurosci,* 21(18):7153-7160.

- Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz R, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole K, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Shanaz D, Oh W, Cotton CM, Stevenson RG, Stoll JB, Lemons JA, Guillet R, Jobe A. 2005. Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *NEJM* , 353:1574-1584.
- Spiegler M, Villapol S, Biran V, Goyenvallé C, Mariani J, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. 2007. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(6):481-490.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. 2004. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*, 46:41-52.
- Trendelenburg G, Dirnagl U. 2005 Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning, *Glia* , 51:307-320.
- Vannucci RC, Perlman JM. 1997. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic Encephalopathy. *Pediatrics*, 100 (6):1004-1114.
- Volpe J, Pasternak J. 1977. Parasagittal cerebral injury in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical and neurological features. *Pediatrics*, 91:472-476.
- Wei LC, Shi M, Chen, LW, Chao R, Zhang P, Chan YS. 2002. Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Dev Brain Res*, 139:9-17.
- Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G, Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. 2000. *J Cerebral Blood Flow*, 20:1149-1165.
- Yang Z, Levison SW. 2006. Hypoxia/Ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neurosci*, 139:555-564.

Zaidi AU, Bessert DA, Ong JE, Xu H, Barks JD, Silvestein FS, Skoff RP. New oligodendrocytes are generated after neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rodents. *Glia*, 46:380-390.

Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. 2001. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neurosci*, 105:33-41.

Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K. 2000. Correlation between Caspase-3 and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral Hypoxia-Ischemia, *J Neurochem*, 75(2):819-829.

Publikation

Spiegler M, Villapol S, Biran V, Goyenvallé C, Mariani J, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. 2007. Bilateral changes after neonatal ischemia in the P7 rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(6):481-490.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Jirikowski vom Institut für Anatomie 2 der Friedrich-Schiller-Universität in Jena für die Vergabe des Themas und seinem Beistand in allen Bereichen der vorliegenden Arbeit. Seine Förderung und Hilfe zur Vorbereitung des Forschungsaufenthaltes sowie die zahlreichen Anregungen und Ratschläge waren mir eine entscheidende Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation.

Ganz besonders möchte ich auch Frau Dr. C. Charriaut-Marlangue, Leiterin der Abteilung HICD am Institut UMR 7102-CNRS in Paris danken für die geduldige Einarbeitung und Einführung in die neurobiologische Forschung. Ihre ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie ihre Anregungen zu neuen Ideen waren für mich ein ständiger Ansporn zu neuen Erfolgen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Mariani, Direktor des Instituts UMR 7102-CNRS in Paris danken, der immer ein offenes Ohr für „la petite allemande“ hatte, konstruktive Kritik übte und damit das Vorankommen der vorliegenden Arbeit entscheidend voran trieb.

Dank gilt auch Dr. S. Renolleau, Pädiater am l'Hôpital Armand-Trousseau und freier Mitarbeiter am Institut UMR 7102-CNRS, der mich die chirurgische Praktik des beschriebenen Tiermodells lehrte, mich zu Ideen anregte und stets tatkräftig förderte.

Auch möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Pariser Instituts danken, die mich so herzlich aufgenommen haben und mir stets zu Rate standen, insbesondere möchte ich nennen C. Véga-Roiatti, C. Goyenvalle, F. Frederic, M. Doulazmi, M. Letellier und S. Fau, sowie S. Villapol vom neurowissenschaftlichen Institut der Universitat Autònoma de Barcelona in Spanien.

Zuguterletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, die immer für mich da ist, mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir stetigen Rückhalt gibt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. G. Jirikowski
Institut für Anatomie 2 der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Dr. C. Charriaud-Marlangue
Université Pierre et Marie Curie (Paris 6),
Institut UMR 7102–CNRS, Frankreich

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 28.09.2009